

Vergleich eines neu entwickelten immunologischen Nachweissystems für die gentechnisch veränderten Roundup Ready® Sojabohnen mit einer DNA-analytischen Methode anhand verschiedener Lebensmittelmatrices

vorgelegt von
Diplom-Lebensmittelchemikerin
Bärbel Jansen

Von der Fakultät für Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktorin der Naturwissenschaften
-Dr. rer. nat.-
genehmigte Dissertation

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. rer. nat. H. Kunzek

Berichter: Prof. Dr. rer. nat. H.-J. Stan

Berichter: Prof. Dr. rer. nat. R. Wittkowski

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 26. September 2003

Berlin 2003

D83

ABSTRACT

In der vorliegenden Arbeit wird die Entwicklung eines immunochemischen Nachweisverfahrens für gentechnisch veränderte Roundup Ready[®] Sojabohnen (RR[®]-Soja) beschrieben. Anhand unterschiedlich prozessierter Lebensmittel sowie Modelllebensmitteln und Bohnenrohmaterial wird der Vergleich der neu entwickelten Methode gegenüber dem bereits bestehenden, auf DNA-analytischer Basis beruhenden Verfahren L 23.01.22-1 gemäß § 35 LMBG, dargestellt.

Zur Extraktion des gesuchten neu in die Pflanze eingeführten Zielproteins der 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphatsynthase (E.C. 2.5.1.19, EPSPS) aus *Agrobacterium* sp. CP4 (CP4 EPSPS) wurde eine Extraktionsmethode etabliert, um flüssige Extrakte für die anschließende Trennung in der Polyacrylamidgelelektrophorese bereit zu stellen. Die besten Resultate wurden mit den Puffern H₂O, 0,01 M PBS und einem Borat-haltigen Puffer zunächst an Bohnenrohmaterial bei 37 °C und 30 min Dauer erreicht.

Die Entwicklung des immunologischen Nachweissystems beruhte auf der Western-blottechnik, deren Detektionssystem über eine Antigen-Antikörperreaktion abläuft. Zur Herstellung der für das System benötigten Antikörper wurde zunächst das Antigen als Fusionsprotein über eine Expressionsklonierung in *E. coli* bereitgestellt. Nach dessen retardierender Reinigung über eine Nickel-Affinitätsäule wurden zwei New Zealand White Kaninchen über einen Zeitraum von 60 Tagen mit zweimaligem boostern zur Gewinnung der Antiseren immunisiert.

Die Antiseren wurden im Anschluss auf ihre Spezifität und Sensitivität hin untersucht. Da das Serum von Kaninchen 1 starke Kreuzreaktionen gegenüber anderen Vertretern der Familie der *Leguminosae* zeigte, die auch durch eine affinitätschromatographische Reinigung nicht beseitigt werden konnten, wurde nur Serum 2 zur weiteren Entwicklung des Testsystems berücksichtigt. Die praktische Nachweisgrenze des Systems wurde im Anschluss mit dem verbliebenen Antiserum mit 0,5 % RR[®]-Soja anhand von zertifiziertem Referenzmaterial bestimmt.

Beim nachfolgenden Vergleich der beiden Untersuchungsmethoden wurden insgesamt 28 verschiedene Proben, von denen 22 sicher eine Toleranz gegenüber dem Herbizid Roundup[®] besaßen, untersucht. Mit der immunochemischen Methode gelang in 9 der 28 Proben der Nachweis einer gentechnischen Veränderung. Mit dem DNA-analytischen Verfahren gelang der Nachweis in 22 der 28 Proben.

Bei den 9 Proben, die im Westernblot als gentechnisch verändert erkannt wurden, handelte es sich durchweg um nicht prozessierte Lebensmittel oder um Lebensmittel, die gering prozessiertes Sojamehl enthielten. Alle anderen Proben waren mehr oder minder starken technologischen Prozessen ausgesetzt, so dass bei der Extraktion nicht mehr ausreichend lösliche Proteine für den Einsatz in die immunochemische Analytik bereitgestellt werden konnten. Die DNA-analytische Methode konnte ohne Probleme auch in den stark prozessierten Lebensmitteln wie z.B. dem Tofu oder dem Texturierten Vegetabilen Protein (TVP) noch eine gentechnische Veränderung nachweisen.

Alle 28 Proben wurden im Anschluss mit der Real-time PCR (TaqMan[™] Prinzip) auf ihren Gehalt an RR[®]-Soja untersucht. Mit dieser Methode ist es möglich, den prozentualen Anteil an RR[®]-Soja im Gesamterzeugnis zu ermitteln und damit die Einhaltung des derzeit gültigen Schwellenwertes von 1 % in der EU (mit Inkrafttreten des Schwellenwertes von 0,9 % wird im Herbst des Jahres 2003 gerechnet) zu überprüfen.

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
ABKÜRZUNGEN.....	IV
1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
1.1 Gentechnisch veränderte Pflanzen als Lebensmittel	1
1.1.1 Novel-Food-VO	1
1.1.2 Verordnung (EG) Nr. 1139/98	2
1.2 Nachweisverfahren	3
1.2.1 Entwicklung von Nachweismethoden gemäß § 35 LMBG	3
1.3 Stand der Analytik	4
1.3.1 DNA-analytische Methoden	4
1.3.2 Proteinchemische Methoden	5
1.4 Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit	7
2. THEORETISCHER TEIL.....	10
2.1 Wirtschaftliche Bedeutung der Sojabohne.....	10
2.1.1 Soja als Nahrungsmittel	10
2.1.2 Gentechnisch veränderte Pflanzen	12
2.2 Gentechnisch veränderte Roundup Ready® Sojabohnen	12
2.2.1 Glyphosat.....	12
2.2.2 Wirkungsweise.....	13
2.2.3 Herbizidtoleranz	14
2.2.4 Konstrukt.....	14
2.3 Grundlagen der angewandten Analytik.....	16
2.3.1 Proteinchemische Methoden	16
2.3.1.1 Proteinextraktion	16
2.3.1.2 Proteinbestimmung	16
2.3.1.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	17
2.3.1.4 Transfer von Proteinen auf Membranen (Westernblot)	18
2.3.1.5 Immunenzymatischer Nachweis (Immunoblotting).....	18
2.3.2 Molekularbiologische Methoden	20
2.3.2.1 DNA-Extraktion aus dem Untersuchungsgut.....	20
2.3.2.2 Methode zum Nachweis gentechnischer Veränderungen in glyphosatresistenten Sojabohnen gemäß § 35 LMBG	20
2.3.2.3 PCR.....	21
2.3.2.4 Quantifizierung von gentechnisch veränderten Pflanzen in Lebensmitteln	23
2.3.2.5 Expressionsvektoren	25
2.3.2.6 Expression rekombinanter Proteine	26
2.3.2.7 DNA-Sequenzierung	27
2.3.3 Reinigung der Antiseren	28
2.3.3.1 Ammoniumsulfatfällung	28
2.3.3.2 Affinitätschromatographie.....	29
2.3.4 Überprüfung der Antiseren nach der Affinitätschromatographie.....	29
3. MATERIAL UND METHODEN.....	30
3.1 Material	30
3.1.1 Chemikalien	30
3.1.2 Antikörper / Antiseren / Enzyme	31
3.1.3 Fertigreagenzien / Kits	31
3.1.4 Marker und „DNA-Leitern“.....	31
3.1.5 Primer und Sonden, bezogen durch TIBMOBOL (Berlin)	32
3.1.6 Organismen/Vektoren	32

3.1.7	Verbrauchsmaterialien	33
3.1.8	Geräte	33
3.1.9	Untersuchungsmaterialien	34
3.1.10	Wässrige Proteinextrakte für Kreuzreaktivitätsuntersuchungen	35
3.2	Versuchsdurchführungen	35
3.2.1	Tofu-Herstellung	35
3.3	Biochemische Methoden	36
3.3.1	Proteinextraktion	36
3.3.2	Proteinbestimmung	37
3.3.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese / Coomassie-Färbung	37
3.3.4	Semi-dry Blotting	38
3.3.5	India-Ink Färbung / AuroDye-Färbung	39
3.3.6	Immunenzymatische Nachweise	39
3.3.6.1	Nachweis der CP4 EPSP-Synthase aus Lebensmittelextrakten	40
3.3.6.2	Nachweis der Reaktivitäten des polyklonalen Kaninchensersums	40
3.4	Molekularbiologische Methoden	41
3.4.1	DNA-Isolierung aus dem Untersuchungsgut mittels CTAB-Methode	41
3.4.2	DNA-Reinigung	42
3.4.3	Konzentrationsbestimmung der DNA	42
3.4.3.1	Fluorometrische Konzentrationsbestimmung	42
3.4.3.2	Gelelektrophoretische Konzentrationsbestimmung	43
3.4.4	Polymerasekettenreaktion (PCR)	43
3.4.4.1	PCR gemäß § 35 LMBG	43
3.4.4.2	Real-time PCR (TaqMan [™] -Technologie) zur Quantifizierung von RR [®] -Soja	44
3.4.5	DNA-Agarosegelelektrophorese	47
3.4.6	DNA-Sequenzierung	48
3.4.6.1	Auswertung der Sequenzierungsdaten	49
3.4.7	Expressionsklonierung	50
3.4.7.1	Bereitstellung von DNA-Fragmenten zur Klonierung	50
3.4.7.2	Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	51
3.4.7.3	Vektoren	51
3.4.7.4	Restriktion von DNA und Plasmiden	51
3.4.7.5	Ligation von DNA-Fragmenten	52
3.4.7.6	Kultivierung von <i>E. coli</i> -Stämmen und Anlegen von Langzeitkulturen	52
3.4.7.7	Transformation von <i>E. coli</i> mittels Elektroporation	53
3.4.7.8	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> (Mini-Präparation)	53
3.4.7.9	Übernachtskulturen	54
3.4.7.10	Proteinexpression durch Induktion	54
3.4.7.11	Gewinnung von Zellextrakten zur SDS-PAGE	54
3.4.7.12	Protein-Reinigung unter denaturierenden Bedingungen	54
3.4.8	Dialyse und Konzentrierung von Proteinlösungen	55
3.4.9	Herstellung polyklonaler Antisera	55
3.4.10	Gesamtreinigung polyklonaler Antikörper aus Kaninchensera	56
3.4.10.1	Ammoniumsulfatfällung	56
3.4.10.2	Affinitätschromatographie	57
4.	ERGEBNISSE	58
4.1	Elektrophoretische Trennung von Sojabohnenextrakten	58
4.2	Entwicklung einer Proteinextraktionsmethode	59
4.2.1	Extraktion von Sojaprotein	59
4.2.1.1	Variation der Extraktionstemperatur und Dauer	59
4.2.1.2	Wirkung von Pufferzusätzen und pH-Wert-Unterschieden	64
4.2.1.3	Verhältnis zwischen Probe und Extraktionspuffer	66
4.2.2	Zusammenfassung der Extraktionsergebnisse	69

4.3	Expressionsklonierung der CP4 EPSPS.....	69
4.3.1	Ermittlung und Überprüfung der Sequenz der CP4 EPSPS	70
4.3.2	Insertion von Restriktionsschnittstellen in das Zielgen	72
4.3.2.1	Optimierung der PCR-Bedingungen.....	72
4.3.3	Überprüfung der Zielsequenz	74
4.3.4	Klonierung der rekombinanten CP4 EPSPS.....	74
4.3.5	Expression der rekombinanten CP4 EPSPS	75
4.4	Gewinnung der polyklonalen Antiseren	76
4.4.1	Immunisierung von Kaninchen.....	76
4.4.2	Kontrolle der polyklonalen Antiseren nach 0, 28, 56 und 60 Tagen	77
4.4.3	Affinitätschromatographische Reinigung der Antiseren	79
4.4.4	Reaktivitäten der Antiseren nach der Affinitätschromatographie	81
4.4.5	Kreuzreaktivitätsuntersuchungen.....	82
4.4.5.1	Zusammenfassung der Kreuzreaktivitätsuntersuchungen	84
4.4.6	Optimierung der Immunreagenzien	85
4.4.7	Sensitivität des RR [®] -Soja Nachweises	86
4.5	Praxisvergleich DNA-Analytik vs. Proteinassay	88
4.5.1	Untersuchung von Modellebensmitteln und Handelsproben	88
4.5.1.1	Nachweis der CP4 EPSPS im Westernblot.....	90
4.5.1.2	Nachweis der gentechnischen Veränderung gemäß Methode § 35 LMBG	95
4.5.1.3	Nachweis der genetischen Veränderung in RR [®] -Sojabohnen mittels Real-time PCR nach der TaqMan [™] Methode	99
5.	DISKUSSION.....	103
5.1	Proteinextraktion	103
5.2	Klonierung der CP4 EPSPS.....	105
	Optimierung der PCR-Bedingungen	105
	Auswahl des Expressionssystems.....	106
5.3	Validierung des Systems Westernblot	107
	Affinitätschromatographische Reinigung der Antiseren	107
	Spezifität der Antiseren.....	108
	Sensitivität.....	109
5.4	Methodenvergleich.....	110
	Auswahl des Untersuchungsmaterials.....	111
	Westernblot vs. PCR.....	112
	Vergleich mit bestehenden immunologischen Testsystemen	114
	PCR gemäß Methode L 23.01.22-1 (§ 35 LMBG)	115
	Real-time PCR (TaqMan [™] Prinzip).....	116
5.5	Einsatzmöglichkeiten des Testsystems	117
	Künftige gesetzliche Regelungen	118
	Resümee.....	120
6.	LITERATUR.....	121

ABKÜRZUNGEN

A (Base)	Adenin
Abb.	Abbildung
Abs.	Absatz
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumperoxidisulfat
AP	Alkalische Phosphatase
Art	Artikel
As	Antiserum
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BIS	NN'-Methylen-Bisacrylamid
BSA	Rinderserumalbumin
BgVV	Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin
Bp	Basenpaar, Anzahl der Basen (A, T, C, G) eines DNA-Fragmentes
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
bzgl.	bezüglich
°C	Grad Celsius
C (Base)	Cytosin
CAMV	Cauliflower Mosaic Virus
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
CTP	Chloroplasten Transit Peptid
cm	Zentimeter
CRM	Zertifiziertes Referenzmaterial
dest.	Destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
dNTP	Desoxynucleotid-Triphosphat, mit N= A, T (U), C und G (Basen)
ddNTP	Didesoxynucleotid-Triphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
durchschn	durchschnittlich
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzym-Linked-Immuno-Sorbent-Assay
EPSPS	5-Enolpyruvylshikimisäure-3-phosphat Synthase
EU	Europäische Union
f	foreword
Fa.	Firma
G Base	Guanin
g	Gramm
GVO	Gentechnisch veränderter Organismus
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactosid
kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L	Liter
lg	Logarithmus zur Basis 10
log	Logarithmus
lt.	laut
LMBG	Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz in der aktuellen Fassung
LMKV	Lebensmittelkennzeichnungsverordnung
LMW-Marker	Low-molecular-weight-Marker
M	Molarität [mol/L]
MG	Molekulargewicht
mA	Milliampere
mAk	Monoklonaler Antikörper

mg	Milligramm
min	Minute
mL	Milliliter
MM	Molekulare Masse
mm	Millimeter
mMol	Millimol
MW	Molecular weight
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
N	Platzhalter für beliebige Basen
NBT	4-Nitroblautetrazoliumchlorid
NC	Nitrocellulose
<i>Nde</i>	Restriktionsenzym aus <i>Neisseria denitrificans</i>
ng	Nanogramm
Ni-NTA	Nickel-Nitrilo-Essigsäure Harz
<i>Nr.</i>	Nummer
<i>Nsi</i>	Restriktionsenzym aus <i>Neisseria sicca</i>
OD	Optische Dichte
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
p-NPP	para-Nitrophenolphosphat
pmol	Picomol
PAA	Polyacrylamid
PAGE	PAA-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PE	Polyethylen
pg	Picogramm
<i>Pwo</i>	<i>Pyrococcus woesei</i>
RR [®] -Soja	Roundup Ready [®] Sojabohnen
r	reverse
rek.	rekombinant
R ²	Regressionskoeffizient
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.o.	siehe oben
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek.	sekundär
sog.	sogenannte
T Base	Thymin
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tertramethylethylendiamin
T _m	Schmelztemperatur der Primer
TNE	Tris-Natriumchlorid-EDTA
Tricine	N-[Tris(hydroxymethyl)-methylglycin
Tris	Tetra(hydroxymethyl)-aminomethan
TT	Tris-Tricine
U (Base)	Uracil
u.a.	unter Anderem
u.U.	unter Umständen
UV	Ultraviolett
UNG	Uracil-N-Glykosilase
V	Volt
vgl.	vergleiche
v/v/-w/v	Volumen pro Volumen-Gewicht pro Volumen
z.B.	zum Beispiel

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

1.1 Gentechnisch veränderte Pflanzen als Lebensmittel

Im April 1996 wurde in der Europäischen Union (EU) erstmals eine Zulassung für den Import eines gentechnisch veränderten pflanzlichen Produktes zur Verwendung als Lebensmittel erteilt. Hierbei handelte es sich um die von der Firma Monsanto entwickelten Herbizid-toleranten Roundup Ready[®] Sojabohnen, deren Zulassung auf der Grundlage des Gentechnikrechtes (Richtlinie 90/220/EWG) erfolgte. Die sog. RR[®]-Sojabohnen besitzen ein zusätzliches Gen (CP4 EPSPS, siehe auch 2.2.4), mit dem sie in der Lage sind, bei einer Herbizidexposition die Synthese aromatischer Aminosäuren aufrecht zu erhalten, während konventionelle Pflanzen absterben. Ebenfalls gemäß Gentechnikrecht wurde im Januar 1997 die von der Firma Ciba-Geigy (heute Syngenta) beantragte Genehmigung für das Inverkehrbringen von transgenem Mais mit integriertem Schutz gegen Insekten erteilt. Die aus den transgenen Sojabohnen und dem transgenen Mais hergestellten Lebensmittel und Lebensmittelzutaten können seither in der EU auf den Markt gebracht werden (Schauzu, 1999).

Für die nach Gentechnikrecht zugelassenen Produkte wurde zum damaligen Zeitpunkt keine Kennzeichnung vorgeschrieben, da es nach EU-Auffassung keine Sicherheitsgründe gab, einen Vermerk auf dem Etikett zu fordern, dass das Produkt durch genverändernde Technik entstanden ist (Schauzu *et al.*, 1998). Um eine gemeinschaftliche, produktspezifische Regelung für das Inverkehrbringen von Lebensmitteln zu schaffen, die aus der Anwendung neuer Rohstoffe, Herstellungsverfahren und Technologien resultieren, wurde seit Anfang der 90er Jahre an einer einheitlichen Gesetzgebung gearbeitet und diese mit Inkrafttreten der sog. Novel-Food-Verordnung (1997) umgesetzt. Der kommerzielle Anbau von gentechnisch veränderten Pflanzen in der Europäischen Union muss nach wie vor gemäß den Richtlinien des Gentechnikrechtes genehmigt werden.

1.1.1 Novel-Food-VO

Die am 15. Mai 1997 in Kraft getretene Verordnung (EG) Nr. 258/97 über neuartige Lebensmittel und Lebensmittelzutaten (sog. Novel-Food-Verordnung) regelt das Inverkehrbringen und die Kennzeichnung u.a. von Lebensmitteln, die aus gentechnisch veränderten Organismen (GVO) hergestellt wurden und sich von vergleichbaren konventionellen Erzeugnissen unterscheiden. Als neuartig im Sinne der Novel-Food-

Verordnung gelten Lebensmittel und Lebensmittelzutaten, wenn sie bisher in der Europäischen Gemeinschaft noch nicht in nennenswertem Umfang für den menschlichen Verzehr verwendet und mit Hilfe neuer Verfahren oder aus bisher nicht üblichen Rohstoffen hergestellt wurden. Dazu gehören insbesondere Produkte aus GVO.

Die Novel-Food-Verordnung sieht eine Kennzeichnungspflicht vor, um den Verbraucher über neue Merkmale oder Ernährungseigenschaften zu informieren. Die zusätzlichen spezifischen Etikettierungsanforderungen regelt Art. 8 der Novel-Food-VO. Die Kennzeichnungsvorschriften gelten umfassend und sehen keine Ausnahmen für bestimmte Angebotsformen vor. Sie gelten sowohl für Fertigpackungen als auch für lose Waren. Zur Konkretisierung der Vorgaben des Art. 8 können Durchführungsbestimmungen erlassen werden (Art. 8, Abs. 3). Gemäß Art 8. Abs. 1a, UAbs. 2 gilt ein neuartiges Lebensmittel oder eine neuartige Lebensmittelzutat als nicht mehr gleichwertig, wenn durch die wissenschaftliche Beurteilung auf der Grundlage einer angemessenen Analyse der Daten nachgewiesen werden kann, dass die geprüften Merkmale Unterschiede gegenüber konventionellen Lebensmitteln oder Lebensmittelzutaten aufweisen. Hinsichtlich der Art und Weise der angemessenen Analyse der vorhandenen Daten macht Art. 8 keine Aussage.

Ausgenommen von der Kennzeichnungspflicht gemäß Novel-Food-VO waren Aromen und Zusatzstoffe wie z.B. Sojalecithin bis zum Inkrafttreten der Verordnung (EG) Nr. 50/2000. In dieser Verordnung wird nun auch die Etikettierung von aus gentechnisch veränderten Organismen hergestellten Zusatzstoffen und Aromen geregelt. Grundlagen der Kennzeichnung sind dieselben wie die in der VO (EG) 1139/98 geforderten Kriterien (Vorhandensein von neuem Protein oder DNA).

1.1.2 Verordnung (EG) Nr. 1139/98

Um eine Kennzeichnung analog den Vorschriften der Novel-Food-VO für die bereits auf dem Markt befindlichen aus gentechnisch veränderten Sojabohnen oder transgenem Mais hergestellten Produkte gemeinschaftlich zu regeln, trat am 1.09.1998 die Ergänzungsverordnung (EG) Nr. 1139/98 (geändert: Verordnung (EG) Nr. 49/2000, durch Ergänzung eines Schwellenwertes von 1 %) zur EG-Etikettierungs-Richtlinie 79/112/EWG in Kraft. Die Verordnung schreibt gemäß Art. 2 Abs. 2 vor, dass die aus dem bereits zugelassenen transgenen Soja und Mais hergestellten Lebensmittel und Lebensmittelzutaten mit dem Hinweis „hergestellt aus genetisch veränderten Sojabohnen“ bzw. „aus genetisch verändertem Mais“ gekennzeichnet werden müssen,

wenn sie rekombinante DNA oder aus der genetischen Modifikation resultierende neue Proteine enthalten.

1.2 Nachweisverfahren

Grundlage zur Kontrolle der Einhaltung der Kennzeichnungsvorschriften gemäß Novel-Food-VO sollen einheitliche Untersuchungsverfahren sein, auf die die zuständigen Überwachungsbehörden der Bundesländer zurückgreifen können. Der Nachweis der gentechnischen Veränderung kann gemäß

VO (EG) 1139/98 über die neu exprimierten Proteine oder über die zusätzlich eingeführten DNA-Sequenzen erfolgen (vgl. Abb. 1). Der Nachweis fremder, zusätzlicher Proteine kann mittels immunochemischer Verfahren erfolgen, wenn diese in ausreichender Menge exprimiert werden. Bei der

Anwendung der Polymerase Kettenreaktion (PCR) als DNA-analytisches Verfahren werden die für eine gentechnische Veränderung spezifischen Genabschnitte nachgewiesen.

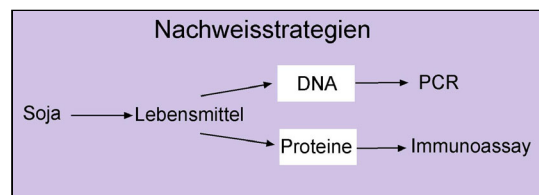


Abb. 1: Nachweismöglichkeiten einer gentechnischen Veränderung: entweder indirekt über das neu exprimierte Protein im Lebensmittel oder direkt durch den Nachweis der veränderten DNA (Meyer, 1999a).

1.2.1 Entwicklung von Nachweismethoden gemäß § 35 LMBG

In Deutschland sieht der § 35 des Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetzes (LMBG) eine Sammlung standardisierter Nachweismethoden zur amtlichen Lebensmittelüberwachung vor. Im Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV) wurde 1994 eine Arbeitsgruppe mit Beteiligung verschiedener Forschungslabore von Bund, Ländern und der Wirtschaft zur Entwicklung und Standardisierung von Methoden zum Nachweis gentechnischer Veränderungen in Lebensmitteln und deren Veröffentlichung in der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren gemäß § 35 LMBG eingerichtet. Die Entwicklung von „§ 35-Methoden“ schafft die Voraussetzungen (Aufarbeitung und Extraktion des Lebensmittels, durchzuführende Kontrollen, prinzipieller Ablauf der Nachweismethode) auch für den Nachweis gentechnischer Veränderungen in einzelnen Lebensmitteln oder Lebensmittelgruppen. Die Validierung dieser Nachweismethoden erfolgt in bundesweiten Ringversuchen unter Beteiligung der Arbeitsgruppenmitglieder.

Die 1998 in die Methodensammlung aufgenommene amtliche Methode L 23.01.22-1 ermöglicht in einem Routineverfahren den spezifischen Nachweis bestimmter DNA-Sequenzen von glyphosat-resistenten RR[®]-Sojabohnen (*Glycine max*) und beruht auf dem Prinzip der PCR.

1.3 Stand der Analytik

1.3.1 DNA-analytische Methoden

Bei den DNA-analytischen Methoden hat sich die Polymerase Kettenreaktion (vgl. 2.3.2.3) zum Nachweis von bekannten Genabschnitten bewährt. Bedingung für dieses Verfahren ist die Kenntnis über die Sequenzdaten des bei der Herstellung des transgenen Organismus verwendeten genetischen Konstrukts mit den Informationen über verwendete Marker-Gene sowie eingesetzter regulatorischer Sequenzen (Promotoren und Terminatoren) (Schauzu, 1996). Die Anordnung der Gensequenzen, die so in der Natur nicht vorkommen, eignen sich für den spezifischen Nachweis der jeweiligen Veränderung (Müller, 1997). Nach der Extraktion der DNA aus dem Lebensmittel werden mit Hilfe der PCR DNA-Sequenzen wie z.B. die Übergänge zwischen Promotoren und Transkriptionsterminatoren, die für die jeweilige gentechnische Veränderung charakteristisch sind, amplifiziert und spezifisch nachgewiesen (Meyer, 1998). Vorteile dieser Methode sind die hohe Sensitivität und Spezifität sowie eine einfache und flexible Handhabung der Methoden. Für den spezifischen Nachweis der gentechnischen Veränderung sind sehr kurze DNA-Sequenzen ausreichend, wie sie auch in stark verarbeiteten Produkten noch auffindbar sind (Candrian, 1994; Schauzu und Broll, 1998).

Einen ersten Hinweis über mögliche genetische Modifikationen bieten sog. Screeningmethoden (Pietsch *et al.*, 1997; Hemmer und Pauli, 1998; Stadler und Hardegger, 1998; Lipp *et al.*, 1999a; Meyer, 1999b), die nur regulatorische Sequenzen wie den Promotor aus dem Blumenkohlmosaikvirus (CaMV 35S-Promotor, vgl. 2.2.4) (Jongedijk, *et al.*, 1992; Golovkin, *et al.*, 1993; Padgett *et al.*, 1995) oder den Terminator des Nopalin Synthase Gens (NOS-Terminator, vgl. 2.2.4) (Padgett *et al.*, 1995) erfassen. Diese Kontrollelemente wurden bei der Mehrzahl der auf dem Markt befindlichen gentechnisch veränderten Pflanzen verwendet (Hemmer, 1997). Der Nachweis dieser DNA-Sequenzen im Genom einer Pflanze reicht als Nachweis einer

gentechnischen Veränderung nicht aus, da die Kontrollelemente auch durch Kontaminationen oder Infektionen der Pflanze stammen können.

Für den spezifischen Nachweis von gentechnisch veränderten Organismen wurden bis heute vier Methoden in Ringversuchen evaluiert und in die Amtliche Methodensammlung gemäß § 35 LMBG aufgenommen. Hierbei handelt es sich um Nachweismethoden für transgene Kartoffeln (L 24.01-1), transgene Mikroorganismen in Rohwurst (L 08.00-44) und Joghurt (L 02.02-4), Bt-176 Mais (L 15.05-1) sowie die Nachweismethode für herbizidtolerante Sojabohnen (L 23.01.22-1) die unter Punkt 2.3.2.2 näher erläutert wird.

Im Allgemeinen können sich Prozessierungsschritte bei der Lebensmittelherstellung wie z.B. hohe Drücke oder Temperaturen sowie sehr niedrige pH-Werte nachteilig auf die PCR auswirken. Diese Behandlungsmethoden führen zu geringen Mengen amplifizierbarer DNA oder stark degradiert DNA bei der Extraktion aus dem Lebensmittel. Eine Kontrolle der Amplifizierbarkeit der isolierten DNA muss bei jeder PCR als Kontrollreaktion mitgeführt werden. Die Anwendbarkeit der Methode für den Nachweis von RR[®]-Sojabohnen nicht nur für Bohnenrohmaterial sondern auch auf im Handel befindliche Lebensmittel wurde 1998 von Broll *et al.* sowie 2000 von Hagen und Beneke untersucht.

1.3.2 Proteinchemische Methoden

Proteinchemische Untersuchungsmethoden sind klassische, in der Lebensmittelanalytik seit langem etablierte Methoden (Belitz und Grosch, 1992). Hierzu zählen elektrophoretische Methoden wie die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und die Isoelektrische Fokussierung (IEF), bei denen die vorhandenen Proteine entweder nach ihrem Molekulargewicht (SDS-PAGE, vgl. 2.3.1.3) oder dem isoelektrischen Punkt (IEF) getrennt werden. Diese Verfahren werden bei der 2-D Gelelektrophorese kombiniert, um den Informationsgehalt beider Verfahren auszuschöpfen. Immunochemische Nachweise wie Immunoblot oder ELISA-Techniken (Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay) basieren auf einer Antigen-Antikörperreaktion, die durch eine enzymatische Reaktion sichtbar gemacht wird und sind in der Lage, neu exprimierte Proteine in Pflanzen nachzuweisen. Eine neue Entwicklung stellen die sog. *Dip Stick* Testsysteme (Stave *et al.*, 1999; Stave und Durandetta, 2000) dar, bei denen, ähnlich wie z.B. bei einem Schwangerschaftstest, das Ergebnis unter minimalem logistischen Einsatz in kürzester Zeit auf einem Teststreifen sichtbar wird. Wichtige Voraussetzungen für den immunochemischen Nachweis

gentechnisch veränderter Proteine sind sowohl die ausreichende Expression des neuen Proteins als auch das Vorhandensein spezifischer mono- oder polyklonaler Antikörper. Da die Menge an Protein in einer Zelle expressionsabhängig ist und die Denaturierung des Proteins eng mit dem Verarbeitungsprozess korreliert, ist u.U. der Nachweis bzw. die Quantifizierung und die Kontrolle etwaiger Grenzwerte schwierig. Bezogen auf den Gesamtanteil an löslichen Proteinen in einer gentechnisch veränderten Pflanze machen die neuen Proteine maximal einen Anteil von 2 % aus, wenn ein starker Promotor eingesetzt wurde (Longstaff *et al.*, 1995).

Haben gentechnische Veränderungen nur eine eingeschränkte Auswirkung auf die Bildung neuer Proteine oder wird kein neues spezifisches Protein wie z.B. bei der FlavrSavrTM-Tomate gebildet, ist die Identifizierung auf proteinchemischer Ebene schwierig bis unmöglich. Ebenfalls ist eine Expression von Proteinen, die nur gewebespezifisch (z.B. beim Bt 176 Mais von Novartis) oder zeitlich begrenzt stattfindet ein Faktor, der bei der Entwicklung von Proteinassays zu beachten ist. Neben den oben erwähnten Testmethoden kann ein Proteinnachweis auch über den Nachweis von Antibiotikaresistenzgenen wie z.B. dem des *kan*-Gens (neomycin-phosphotransferase type II gene) bzw. seinem Produkt der NPT II geführt werden. Das *kan*-Gen vermittelt in Bakterien eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Kanamycin.

Das NPT II Gen ist in 17 von 28 weltweit zugelassenen gentechnisch veränderten Pflanzen enthalten. Daher bietet es, bei der Existenz von spezifischen Antikörpern, die Möglichkeit zur Entwicklung einer Screening-Methode auf immunologischer Basis, ähnlich dem Screening nach dem CaMV35S-Promotor auf DNA-Basis (Hemmer, 1997).

Gegenwärtig sind zwei verschiedene immunologische Verfahren zur Überprüfung von GVO in Pflanzenmaterial bzw. Lebensmitteln vorhanden. Die Assays basieren a) auf der Immunoblottechnik (Firma TNO, Niederlande) und b) auf der Sandwich-ELISA Technik (Strategic Diagnostics Inc, SDI, Newark, DE, USA/Hanse Analytik Bremen). Der kommerzielle Nachweis der Fa. TNO von RR[®]-Sojaproteinen weist gemäß Herstellerangaben eine Sensitivität von 1 % bei ungerösteten Soja-Mehlen auf. Das Nachweisverfahren ist qualitativ und beruht auf der Detektion des zusätzlichen CP4 EPSPS 47 kDa Proteins in der herbizid-toleranten Sojabohne. Die gentechnische Veränderung gilt bei der Detektion der zusätzlichen Proteinbande als nachgewiesen. Dieses Testsystem eignet sich gemäß TNO nur für den Nachweis von nicht

prozessierten Soja-Produkten. Für den Nachweis von Texturiertem Vegetabilen Protein (TVP) oder fermentierten Produkten liegen keine Untersuchungsergebnisse vor.

Der kommerziell von der Firma SDI/Hanse Analytik erhältliche ELISA-Kit, basierend auf der Sandwich-Technik, detektiert bis zu 2 % RR[®]-Soja im untersuchten Produkt und wurde in einem Ringversuch mit 38 Teilnehmern in der EU validiert (Lipp und Anklam, 2000). Die Kavitäten der Mikrotiterplatten sind mit einem gegen die CP4 EPSPS gerichteten monoklonalen Antikörper beschichtet. Bei Anwesenheit des neuen zusätzlichen Proteins wird dieses spezifisch aus dem Untersuchungsgut gebunden und mit einem zweiten enzymmarkierten Antikörper detektiert. Die Untersuchung beschränkt sich lt. Vertreiber allerdings nur auf entfettete sowie nicht entfettete Sojamehle, die dem Test als Referenzen beigelegt sind. Jeweils abhängig vom Untersuchungsgut müssen Eichreihen mit dem beigelegten Referenzmaterial erstellt werden. Eine globale Untersuchung auf Fremdproteine ist mit diesem System nicht möglich.

1.4 Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Arbeit war eine systematische Untersuchung, unter welchen Bedingungen es möglich ist, mit proteinanalytischen Verfahren einen eindeutigen Nachweis auf Fremdproteine in Lebensmitteln unterschiedlichster Herkunft zu führen. Auch ist ein immunologisches Verfahren, das in der Lage ist, neu exprimierte Proteine auch in verarbeiteten Sojaprodukten nachzuweisen, z.Zt. nicht verfügbar. Neuere Publikationen zur Thematik DNA-Analytik vs. Proteinanalytik, beschränken sich auf das Zusammenstellen von Literatur (Ahmed, 2002) oder ausschließlich auf die Untersuchung von zertifizierten Referenzmaterialien (Lin *et al.*, 2001).

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines Nachweissystems, das sowohl zur Untersuchung von „zusammengesetzten“ Lebensmitteln mit Sojabestandteilen als auch für unterschiedlich prozessierte Sojabestandteile und Rohmaterialien eingesetzt werden kann.

Das hier neu entwickelte immunologische Testsystem und das vorhandene DNA-analytische Routineverfahren nach § 35 LMBG (L 23.01.22-1, vgl. 1.2.1) sollten daher im Anschluss zur Detektion von RR[®]-Soja an Rohmaterialien und unterschiedlich verarbeiteten Modelllebensmitteln sowie kommerziell erhältlichen Lebensmitteln erprobt werden. Aus der Interpretation der ermittelten Resultate können Vor- und Nachteile, basierend auf dem direkten Vergleich beider an den identischen Proben

eingesetzten Untersuchungsverfahren, benannt werden. Ebenso sind Rückschlüsse auf die Qualität und die praktische Anwendbarkeit beider Methoden möglich. Aufgrund der Auslegung der kommerziell verfügbaren immunochemischen Nachweise (vgl. 1.3.2) lag das Hauptinteresse der Arbeit auf der Entwicklung des immunologischen Testsystems zum sicheren Nachweis von Proteinen, die der genetischen Modifikation von RR[®]-Sojabohnen entstammen. Durch die Möglichkeit der direkten visuellen Auswertung der Ergebnisse und der denaturierenden Bedingungen bei der Anwendung, wurde der Immunoblot dem ELISA vorgezogen. Die Möglichkeit einer Quantifizierung von RR[®]-Soja-haltigen Proben gegenüber der CP4 EPSPS oder zertifiziertem Referenzmaterial (CRM, Fluka) als Standard mittels ELISA-Technik wurde aufgrund des nicht ausreichenden rekombinanten Proteins zunächst nicht berücksichtigt, kann aber in Folgeprojekten realisiert werden.

Bei der Auswahl des Antikörpersystems fiel die Entscheidung zugunsten der Herstellung von polyklonalen Antiseren. Brett *et al.* (1999) beschreiben monoklonale und polyklonale Antikörper als gleichwertige Instrumente, wobei deren Entwicklung immer unter Berücksichtigung der Anforderungen des zu entwickelnden Testsystems erfolgen sollte. Bedingt durch die Ausrichtung des Testsystems sollte der Antikörper sowohl in hohem Maße sensitiv, als auch an vielen verschiedenen Untersuchungsmatrices einsetzbar sein. Während polyklonale Antikörper in der Lage sind, unterschiedliche Teile des Zielproteins zu „erinnern“, weisen monoklonale Antikörper nur eine Erkennungssequenz auf, die im Vergleich dazu begrenzt ist. Der Vorteil monoklonaler Antikörper besteht darin, dass sie nach der Fusion mit Hybridomzellen (Köhler und Milstein, 1975) unbegrenzt und in gleichbleibender Qualität zur Verfügung stehen.

Schematischer Ablauf der durchgeführten Arbeiten:

1. Entwicklung einer Proteinextraktionsmethode mit robusten Extrakten aus Rohmaterialien und prozessierten Lebensmitteln nach Überprüfung verschiedener Pufferzusammensetzungen.
2. Herstellung polyklonaler Antikörper durch Immunisierung von New Zealand White Kaninchen nach Expressionsklonierung der CP4 EPSPS in einem bakteriellen Vektor.

3. Entwicklung und Validierung des immunochemischen Testsystems, das sowohl Bohnenrohmaterial, „zusammengesetzte“ Lebensmittel mit Sojabestandteilen sowie auch stark verarbeitete Produkte mit Sojaanteilen (vgl. Abb. 3) erfasst.
4. Vergleich des entwickelten Testsystems mit dem DNA-Routineverfahren (L 23.01.22-1) an Modelllebensmitteln sowie an Handelsproben mit unterschiedlichen GVO-Anteilen, die die Komplexität der Lebensmittelmatrix erfassen. Da die Verordnung (EG) 1139/98 (siehe 1.1.2) über das zu verwendende Analysenverfahren zur Überprüfung der Kennzeichnungspflicht von potentiell GVO-haltigen Lebensmitteln keine Aussage macht, wurden die Nachweise der rekombinanten DNA oder des neu exprimierten Proteins zu Beginn dieser Arbeit als gleichwertige Verfahren angesehen.

2. THEORETISCHER TEIL

2.1 Wirtschaftliche Bedeutung der Sojabohne

Die Sojabohne (*Glycine max.* [L.] Merr.) gehört zur Familie der *Leguminosae* (OECD, 2000) und zählt zu den Pflanzenarten mit weltweit größter Bedeutung. Ihre reifen Samen werden auch als Hülsenfrüchte oder Leguminosen bezeichnet und dienen in unterschiedlichen Formen der Ernährung. Sojabohnen enthalten sowohl einen sehr hohen Proteinanteil als auch einen sehr hohen Ölanteil. Aufgrund dieser Tatsache wird die Sojabohne auch zu den Ölsaaten gerechnet (Belitz und Grosch, 1992). Mehr als die Hälfte des weltweit produzierten Pflanzenöls stammt aus der Sojabohne und liegt damit vor den Ölpalmen und Raps. Im Kalenderjahr 2001 hat sich die Ölsaatenverarbeitung gemäß Oil World (2001) um 2 % auf 29,6 Mio. t erhöht. Aufgrund des hohen Proteingehaltes (vgl. Abb. 2) dominiert Soja auch bei der Deckung des weltweiten Bedarfs an Mehl und Sojaschrot für die Tierernährung.

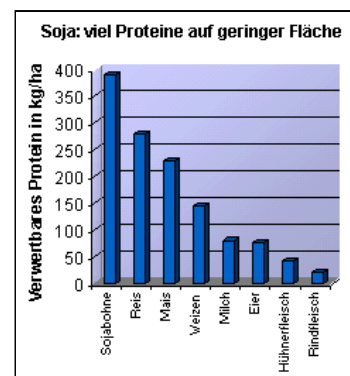


Abb. 2: Gegenüberstellung der Hauptproteinlieferanten in der Ernährung (transgen, 2003).

Die EU ist weltweit der größte Importeur von Sojabohnen und Sojaschrot. Im Jahr 2000 wurden 16 Mio. t (Anteil Deutschland: 3,8 Mio. t) Sojabohnen überwiegend aus den USA und Brasilien importiert und in Ölmöhlen zu Sojaöl (3,0 Mio. t) und Sojaschrot (11,5 Mio. t) verarbeitet. Die EU führte zusätzlich im Jahr 2000 ca. 17 Mio. t (Anteil Deutschland: 2,0 Mio. t) bereits verarbeitetes Sojaschrot ein. Dieses Sojaschrot wird als Tierfutter verwendet, ohne dessen Einsatz die europäische Fleischerzeugung nicht möglich wäre (transgen, 2002). Aufgrund der BSE-Krise und des Fütterungsverbotes von Tiermehl in der EU im Dezember 2000 (Entscheidung 2001/25/EG) stieg der Einsatz von Sojaschrot im Mischfutter (Menz, 2001) in 2000/01 um 13 % auf 2,6 Mio. t im Vergleich zum Vorjahr an.

2.1.1 Soja als Nahrungsmittel

Soja ist Rohstoff für verschiedenste Lebensmittelzutaten und Zusatzstoffe. Zur Verbesserung der Proteinversorgung oder zur Hebung der Verarbeitungsqualität wird

Soja bei der Herstellung von Fleischwaren, Kindernahrungsmitteln und Backwaren eingesetzt. Ausgangspunkt von Sojaproteinzutaten sind entfettete Sojaflocken, die vor ihrer Verwendung erhitzt werden müssen, um die sojaeigenen Proteinase-inhibitoren und Lectine zu inaktivieren. Einen Überblick über die wichtigsten Verfahrensschritte bei der Sojaverarbeitung gibt Abbildung 3. In China und Japan haben Anbau und Verarbeitung von Sojabohnen eine lange Tradition.

Sojabohnen werden eigens zu Konsumzwecken angebaut und allein oder zusammen mit Getreide zu einer Vielzahl von fermentierten Produkten sowie zu traditionellen Produkten wie Sojamilch,

Sojasoße, Tofu, oder Tempeh verarbeitet. In Europa haben Sojaprodukte erst seit den 70er Jahren als Alternative zu Fleisch und Milchprodukten eine Bedeutung.

Soja ist eine einjährige, selbstbefruchtende Pflanze und stammt ursprünglich aus China (Hymowitz, 1970). Auch beim großflächigen Anbau braucht die Sojapflanze in der Regel keine stickstoffhaltigen Düngemittel, da sie symbiotisch mit dem Bakterium *Bradyrhizobium japonicum* lebt, das Stickstoff aus der Umgebungsluft fixiert (Kull, 1993). Als Kurztagespflanze (Bornkamm, 1990) ist Soja zwischen dem 45. Breitengrad und dem Äquator in den Hauptanbaugebieten USA, Brasilien, Argentinien und China angesiedelt. Soja verträgt in der Blühperiode keine Kälteeinbrüche. Aufgrund der Witterungsbedingungen ist der Anbau in der EU auf geringe Flächen in Italien (1,0 Mio. t) und Frankreich (220.000 t) beschränkt.

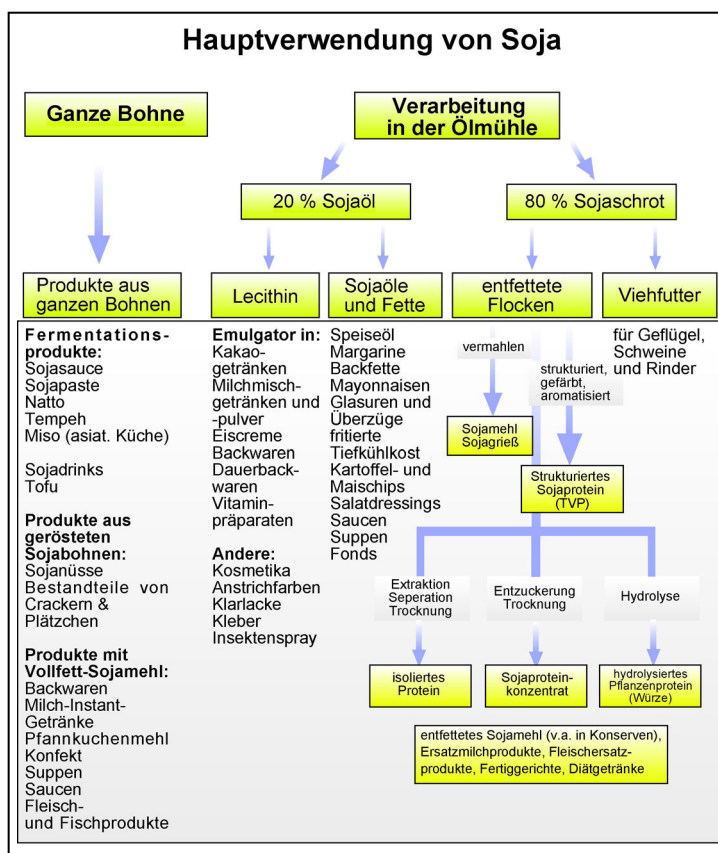


Abb. 3: Verfahrensschritte bei der Sojaverarbeitung. Zur Lebensmittelherstellung werden hauptsächlich Sojaverarbeitungsprodukte aus Ölmühlen benötigt. Zur Herstellung traditioneller Produkte werden immer die ganzen Bohnen verwendet.

2.1.2 Gentechnisch veränderte Pflanzen

Die Anbauflächen für gentechnisch veränderte Pflanzen sind im Jahr 2002 (James, 2002) weltweit weiter angestiegen und haben eine Fläche von 58,7 Mio. ha. erreicht. Gegenüber dem Vorjahr wurde noch einmal ein Anstieg der Anbaufläche um 6,1 Mio. ha verzeichnet. Der Anstieg geht vor allem auf das Konto von Soja, Mais und Raps. Bei Baumwolle (Herbizid- und Insektenresistenz) blieb der Anteil mit 6,8 Mio. ha nahezu unverändert. Die Flächen für Soja (Herbizidresistenz) wuchsen auf 36,5 Mio. ha und bei Mais (Herbizid- und Insektenresistenz) nach bisher rückläufigen Zahlen um ein Viertel auf 12,4 Mio. ha.

99 % des Anbaus entfallen auf vier Länder: USA (35,7 Mio. ha), Argentinien (11,8 Mio. ha), Kanada (3,2 Mio. ha) und China (1,5 Mio. ha). China verzeichnete auch 2002 den größten Zuwachs an Anbaufläche für gentechnisch veränderte Baumwolle auf nunmehr 2,1 Mio. ha. Gentechnisch veränderte Sorten haben sich vor allem bei Soja durchgesetzt. Auf sie entfallen 51 % der Weltproduktion. Bei Soja dominiert die Herbizidresistenz mit 75 %, bei Mais (9 %) und Raps (12 %) liegen die Anteile deutlich geringer. Drei neue Anbauländer sind 2002 hinzugekommen: Indien und Kolumbien mit Bt-Baumwolle und Honduras mit Bt-Mais.

2.2 Gentechnisch veränderte Roundup Ready® Sojabohnen

Die gentechnische Veränderung der von der US amerikanischen Firma Monsanto entwickelten Roundup Ready® Sojabohne resultiert in einer erhöhten Verträglichkeit gegenüber dem Totalherbizid Glyphosat (Abb. 4), das die 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphatsynthase (EPSPS, E.C. 2.5.1.19) im pflanzlichen Organismus hemmt. Die EPSPS katalysiert im sog. Shikimat-Weg die Synthese aromatischer Aminosäuren, dargestellt in Abbildung 5 (Karlsson, 1988).

2.2.1 Glyphosat

Roundup® ist ein Handelsname der Fa. Monsanto und bezeichnet eines der meistgenutzten Totalherbizide. Wirksamer Bestandteil von Roundup® ist das Glyphosat oder auch [N-(Phosphonomethylglycin)], siehe Abbildung 4. Für den Menschen ist es

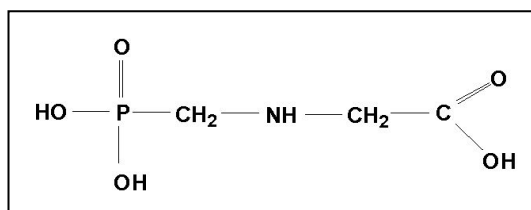


Abb. 4: Chemische Struktur des Herbizides Glyphosat [N-(Phosphonomethylglycin)]. Der Handelsname des von Monsanto vertriebenen Herbizids ist Roundup®.

nicht toxisch ($LD_{50} = 4300 \text{ mg/kg}$) (WHO, 1994). Es kann allerdings Irritationen im Magen-Darm-Trakt hervorrufen. Es wird durch Bodenbakterien wie z.B. *Pseudomonas* und *Flavobacter* metabolisiert und ist am Boden nicht wirksam, daher relativ umweltfreundlich und biologisch abbaubar (Brandt, 1995). Die genannten Bakterien können Glyphosat als PO_4^{2-} -Quelle nutzen und metabolisieren es zu Aminoethylphosphonsäure, Sarcosin und Glycin. Glyphosat wirkt systemisch. Es wird zur Unkrautbekämpfung auf die grünen Pflanzenteile aufgebracht und über das Phloem innerhalb der Pflanzen zu den Chloroplasten transportiert.

2.2.2 Wirkungsweise

Glyphosat hemmt im Shikimisäureweg bei der Biosynthese aromatischer Aminosäuren das Enzym 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphatsynthase (EPSPS) reversibel, dargestellt in Abbildung 5. Die EPSPS wird im Cytoplasma synthetisiert und bei Pflanzen, vermittelt durch ein Chloroplasten Transit Peptid (CTP) zu den Chloroplasten transportiert (Kishore und Shah, 1988). Dort katalysiert die EPSPS die Kondensation von PEP und 3-Phosphoshikimat zu 5-Enolpyruvylshikimat 3-phosphat einer Vorstufe des Chorismates. Bei der Anwendung von Glyphosat wird diese Kondensation kompetitiv gehemmt, und es können keine aromatischen Aminosäuren gebildet werden (Steinrucken und Amrhein, 1980, 1984). Insbesondere Pflanzen aber auch Mikroorganismen benötigen die EPSPS zur Synthese der aromatischen Aminosäuren (für den Menschen essentiell) Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan und Sekundärstoffen wie z.B. Tocopherol, Lignin, Ubichinon und Plastochinon. Durch das Fehlen der Aminosäuren wird die Proteinsynthese unterbrochen und die Pflanze stirbt nach 3-7 Tagen ab.

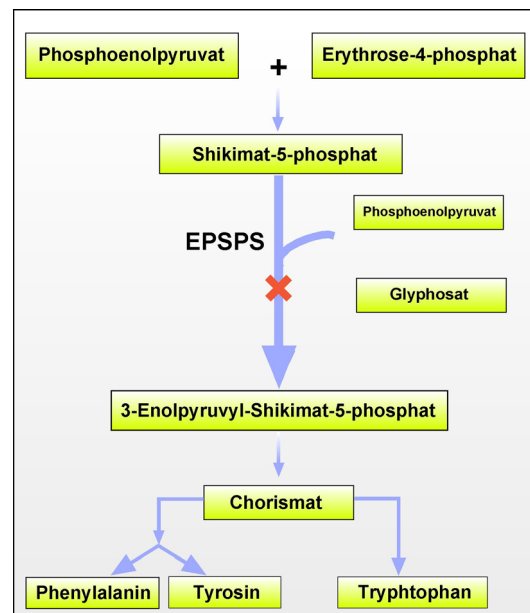


Abb. 5: Wirkungsweise von Glyphosat. Das Enzym katalysiert die Anlagerung von Phosphoenolpyruvat an Shikimat-3-Phosphat, einem Intermediat vom Chorismat, aus welchem die aromatischen Aminosäuren gebildet werden.

2.2.3 Herbizidtoleranz

Mit dem Begriff Totalherbizid wird deutlich, dass diese Herbizide gegenüber einem großen Spektrum an Pflanzenarten, sowohl gegen Unkräuter als auch gegen Kulturpflanzen, wirksam sind. Durch die Übertragung von bakteriellen Herbizidtoleranzgenen auf Kulturpflanzen sind diese in der Lage, eine Herbizidexposition zu überstehen, während Unkräuter absterben (Shah *et al.*, 1986,). Bei den glyphosat-toleranten Roundup Ready[®] Sojabohnen wurde diesen, die aus dem Stamm des Bodenbakteriums *Agrobacterium* sp. Strang CP4 isolierte genetische Information für die EPSPS, kurz CP4 EPSPS übertragen (vgl. Abb. 6). Diese verfügt über dieselbe Stoffwechseleigenschaft wie das pflanzliche Enzym, ist aber unempfindlich gegenüber Glyphosat. Die aus dem Bodenbakterium isolierte EPSPS musste sowohl eine hohe Toleranz gegenüber Glyphosat, als auch eine gleichbleibende Affinität gegenüber dem Substrat Phosphoenolpyruvat (PEP) besitzen, um die Aufgaben des blockierten pflanzeigenen EPSPS-Enzyms zu übernehmen (Barry *et al.*, 1992).

Die aus dem Agrobakterienstamm CP4 isolierte EPSPS weist im Gegensatz zu den aus anderen Bakterienstämmen wie *Pseudomonas* sp. Strang PG2982 oder *Achromobacter*

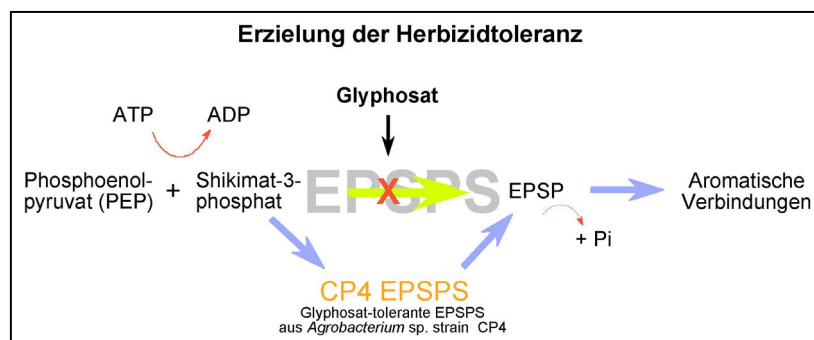


Abb. 6: Mechanismus zur Erzielung einer Herbizidtoleranz durch Übertragung bakterieneigener CP4 EPSPS.

sp. Strang LBBA isolierten EPSPSs diese Eigenschaften auf. Sie ist unempfindlich gegenüber Glyphosat und übernimmt die Funktion des inaktivierten pflanzlichen Enzyms bis zu einer Belastung von 168 kg Glyphosat/ha. Kommt es zu einer Herbizidexposition, wird die pflanzeigene EPSPS nach wie vor gehemmt, aber durch die zusätzliche genetische Information produziert die Sojabohne ein weiteres EPSPS-Enzym, das die Aminosäuresynthese aufrecht erhält.

2.2.4 Konstrukt

Die Übertragung der Herbizidtoleranz auf die Sojabohnen wurde mit dem Plasmid PV-GMGT04 (Padgett *et al.*, 1995), das alle nötigen Informationen zur Expression der CP4 EPSPS beinhaltet, realisiert. Bei den Roundup Ready[®] Sojabohnen gelang es nur,

einen Teil des vorgesehenen Plasmides in das Pflanzengenom zu integrieren. Das Plasmid enthält ursprünglich zwei Kopien des Zielgens sowie ein bakterielles Selektionsgen (*kan*) für eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Kanamycin und das Markergen *gus*. Aufgrund dieser Begebenheit enthält die gentechnisch veränderte

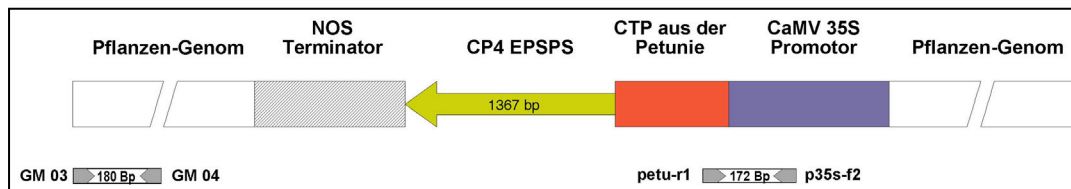


Abb. 7: Struktur des Konstruktes der gentechnisch veränderten Roundup Ready® Sojabohnen von Monsanto. Grün dargestellt ist das Zielgen (CP4 EPSPS) aus *Agrobacterium* sp. Strang CP4, das, vermittelt durch das Chloroplasten-Transit-Peptid (CTP) aus *Petunia hybrida*, in die Chloroplasten geschleust wird und dort abgespalten seine Funktion erlangt. Das gesamte in die Sojabohne integrierte Konstrukt hat eine Größe von 2267 Bp. Dargestellt sind auch die spezifischen Primer p35s-f2/petu r 1 für das Nachweissystem gemäß § 35 LMBG (vgl. 2.3.2.2).

Sojabohne kein sog. Antibiotikaresistenzgen. Das in die Sojabohne eingeschleuste Konstrukt enthält alle nötigen regulatorischen Genabschnitte (Promotor, Zielgen, Terminator) um die gewünschte Modifikation in der Pflanze zu etablieren und ist in Abbildung 7 schematisch dargestellt.

Das integrierte Fragment umfasst einen Teil des CaMV35S-Promotors, das Chloroplasten Transit Peptid (CTP) aus der Petunie, die CP4 EPSPS (Zielgen) aus *Agrobacterium* sp. Strang CP4 und den Terminator des Nopalin-Synthase Gens aus *Agrobacterium tumefaciens*.

Der CaMV 35S-Promotor stammt aus dem Blumenkohlmosaikvirus und ist ein starker Promotor der in allen Pflanzenteilen aktiv ist. Er stellt die Startregion für die Transkription dar und steuert die Aktivität des Gens. Über das Chloroplasten Transit Peptid wird eine Vorstufe der CP4 EPSPS vom Cytoplasma in die Chloroplasten transportiert. Das CTP wird dort abgespalten und abgebaut, so dass ein voll aktives, glyphosat-tolerantes Enzym in den Chloroplasten vorliegt (della-Cioppa *et al.*, 1986). Der NOS-Terminator zeigt das Ende des Gens und damit das Ende der Transskription an.

2.3 Grundlagen der angewandten Analytik

2.3.1 Proteinchemische Methoden

2.3.1.1 Proteinextraktion

Die Gewinnung reproduzierbarer Proteinextrakte bei gleichbleibend hoher Extraktionseffizienz diente der Herstellung geeigneter Messlösungen für den Einsatz in den immunochemischen Untersuchungen. Die Entwicklung einer geeigneten Extraktionsmethode entsprechend diesen Vorgaben wurde mittels Sojabohnenrohmaterial mit und ohne RR[®]-Soja Anteil zunächst unter Verwendung des freundlicherweise von der Firma TNO (Niederlande) zur Verfügung gestellten monoklonalen Antikörpers realisiert. Auch während der Entwicklung des immunochemischen Testsystems wurde dieser Antikörper anfänglich zu Vergleichen von Reaktivitäten verwendet. Geänderte Bedingungen bei der Extraktion wurden bei der Methodenentwicklung laufend aktualisiert und dem jeweiligen Entwicklungsstand der Methode angepasst.

Die CP4 EPSPS ist in Sojabohnen in den Chloroplasten lokalisiert und wird durch wässrige Lösungsmittel extrahiert. Zur nachfolgenden Detektion des Enzyms aus wässrigen Proteinlösungen wurden unterschiedliche Extraktionspuffer in ihrer Anwendung und Funktionalität überprüft. Dabei wurden verschiedene Parameter bzgl. der Art des Puffers, Extraktion aus dem Rohmaterial oder verarbeiteten Lebensmittel, Pufferzusätze wie Detergenzien und pH-Wert sowie Extraktionsdauer und Temperatur und das Verhältnis zwischen dem Puffer und dem zu extrahierenden Gewebe (Padgett, 1995) berücksichtigt. Ziel war es hierbei, eine einfach durchführbare Probenaufarbeitung zu entwickeln, die geeignete Extrakte aus verschiedenen Proben und unterschiedlichen Verarbeitungszuständen lieferte. Die Auswirkungen der Variation der Extraktionsparameter auf die Qualität der Proteinextrakte wurden mittels PAA-Gelelektrophorese und Immunoblot untersucht. Alle Extrakte wurden nach der Extraktion bei der Zentrifugation abgekühlt, so dass sich der Fettanteil der Proben oberhalb der wässrigen Phase absetzte.

2.3.1.2 Proteinbestimmung

Die Ermittlung des Proteingehaltes der verwendeten wässrigen Lösungen, Leguminosenextrakte und Lebensmittel erfolgte mit der Methode nach Bradford, (1976). Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G 250 liegt in Abhängigkeit vom pH-

Wert in einer rotbraunen Form im Sauren (Absorptionsmaximum $\lambda = 450 \text{ nm}$) und einer blauen Form im Basischen (Absorptionsmaximum $\lambda = 595 \text{ nm}$) vor. Wenn vorhandene Proteine durch ionische und apolare Wechselwirkungen mit basischen und aromatischen Aminosäuren nicht-kovalente Bindungen eingehen, geht in saurer Lösung die rote Form des Farbstoffes in die blaue Form über und das Absorptionsmaximum wird in Richtung $\lambda = 595 \text{ nm}$ (entspricht der Meßwellenlänge) verschoben. Die Komplexbildung erfolgt innerhalb von 5 min, und der Komplex bleibt etwa 1 h stabil. Die Messung der Proben erfolgt photometrisch gegen eine BSA-Standardreihe bekannter Konzentration ausgehend von 1 mg/mL. Als Leerwert dient eine entsprechende Lösung mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ anstelle der Proteinlösung.

2.3.1.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Bei der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine aufgrund ihrer unterschiedlichen Mobilität, bedingt durch unterschiedliche Molekulargewichte, im elektrischen Feld getrennt. Bei der Vertikalelektrophorese bestehen die verwendeten Polyacrylamidgele aus einem oberen grobporigen Sammelgel und dem ihm folgenden engmaschigeren Trenngel. Sie werden in dieser Anordnung als diskontinuierlich bezeichnet (Ornstein, 1964; Davis, 1964).

Vor der Gelauftragung wird die Proteinlösung zusammen mit SDS im Überschuß bei 95 °C aufgeköcht, und dabei die Eigenladung der Proteine vollständig durch die SDS-Beladung überdeckt und alle nichtkovalenten Bindungen zerstört. Die Proteine verlieren ihre ursprüngliche Konformation und werden dabei proportional zu ihrem Molekulargewicht mit negativer Ladung besetzt. Dabei entstehen anionische Mizellen mit konstanter negativer Nettoladung pro Masseneinheit, ca. 1,4 g SDS pro g Protein (Laemmli, 1970, Westermeier, 1997), die beim Anlegen einer Spannung mit einer zu ihrem Molekulargewicht proportionalen Geschwindigkeit durch die Poren des Gels zur Anode wandern.

Mit dem Zusatz von DTT als reduzierender Thiolverbindung im Probenpuffer werden zusätzlich die Disulfidbindungen gelöst und die Proteinstränge vollständig gestreckt. Beim Anlegen einer Spannung ordnen sich die aufgetragenen Proteine in scharfen Zonen mit geringer werdender Mobilität im Sammelgel an. Beim Erreichen des Trenngels findet eine Fokussierung an der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel statt. Die Proteine erfahren im Trenngel einen höheren Reibungswiderstand und ordnen sich im homogenen Puffermilieu auf Grund des Molsiebeefferes nach Ladung und

Größe an. Die Porengröße des Gels wird durch die Konzentration an Acrylamid und Bisacrylamid bestimmt. Die Gelmatrix entsteht durch die Polymerisation von Acrylamidmonomeren zu langen Ketten.

Die getrennten Proteine können im Anschluss an die Elektrophorese durch klassische Färbemethoden wie z.B. der Coomassie-Färbung visualisiert werden. Diese Färbemethode beruht auf der Bindung des Säurefarbstoffes Coomassie Brilliant Blue R-250 an basische und aromatische Aminosäurereste von Proteinen. Durch den Transfer auf geeignete Membranen werden die getrennten Proteine für immunochemische Nachweisreaktionen vorbereitet.

2.3.1.4 Transfer von Proteinen auf Membranen (Westernblot)

Der Transfer der getrennten Proteinextrakte auf NC-Membranen (0,2 µm) erfolgt im Anschluss an die Elektrophorese nach dem diskontinuierlichen Semi-Dry-Blotting-Prinzip (Khyse-Andersen, 1984)

und wird als Westernblotting bezeichnet. Die Proteine wandern mit der gleichen Geschwindigkeit (isotachophoretischer Effekt) aus dem Gel, wie die Anionen aus dem Puffer, in Richtung Anode,

in die NC-Membran. Durch diese Methode werden die getrennten Proteine in ihrer Gesamtheit auf den NC-Membranen fixiert und sind leichter für nachfolgende Detektionsverfahren zugänglich. Der Aufbau einer Transfereinheit zum Semi-Dry-Transfer ist in Abbildung 8 dargestellt. Zur Vermeidung unspezifischer Reaktionen werden freie Bindungsstellen der Membran nach dem Transfer mit Milchpulver oder BSA abgesättigt.

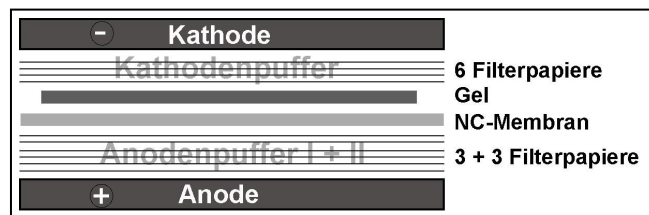


Abb. 8: Schematische Darstellung des Aufbaus der Bloteinheit. Je nach Blotmethode kann die Anzahl der Filterpapierschichten variieren (Westermeier, 1997).

2.3.1.5 Immunezymatischer Nachweis (Immunoblotting)

Die Technik des immunezymatischen Nachweises auf NC-Membranen wurde in dieser Arbeit für verschiedene Fragestellungen eingesetzt. Basis der ablaufenden immunochemischen Reaktionen ist das Fixieren der nach ihrem Molekulargewicht getrennten Proteine auf NC- oder Teflonmembranen. Die Wahl der Membran ist abhängig von der späteren Detektionsmethode. Eine Detektion mit alkalischer

Phosphatase wird idealerweise auf NC-Membranen durchgeführt, während bei einer Chemilumineszenzdetektion mit PVDF-Membranen gearbeitet werden muss. Das Arbeiten mit Chemilumineszenz erfordert zudem ein Detektionssystem, um die entstandenen Lichtsignale zu detektieren.

Mit dem immobilisierten rekombinanten Protein (CP4 EPSPS) wurden polyklonale Antiseren auf ihre Funktionalität und Reaktivität überprüft, nachdem das Protein gemäß seiner molekularen Masse auf der NC-Membran fixiert wurde. Mit dieser Technik kann auch der Nachweis und die Suche von extrahierten Proteinen aus Pflanzen oder Lebensmittelproben durchgeführt werden, wenn ein entsprechend spezifisches Antiserum vorliegt.

Der immunochemische Nachweis des Enzyms EPSP-Synthase erfolgt durch Detektion einer Bande mit einem Molekulargewicht von 47,7 kDa im getrennten Bandenmuster. Grundlage der ablaufenden Farbreaktion ist die Inkubation der NC-Membranen mit polyklonalen Antiseren oder einem monoklonalen Antikörper (mab) über Nacht. Findet eine AG-AK

Reaktion statt, bindet der Antikörper spezifisch an das fixierte Antigen auf der NC-Membran. Zum Nachweis sowohl der

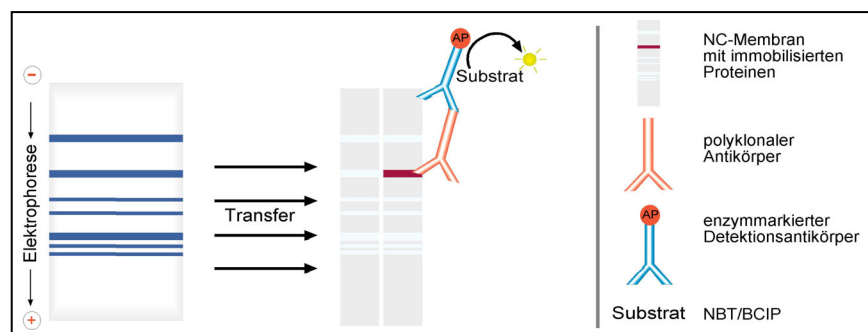


Abb. 9: Schematische Darstellung der Immundetektion durch enzymmarkierte Antikörper. Das Enzym alkalische Phosphatase wird durch das Substrat NBT/BCIP umgesetzt. Dies führt zur Visualisierung von AG-AK-Reaktionen auf der NC-Membran.

immobilisierten Proteine als auch der gebundenen Antikörper werden enzymmarkierte und mit alkalischer Phosphatase konjugierte, sekundäre Nachweisantikörper in einem zweiten Inkubationsschritt verwendet. Die Detektion der gesuchten Proteine (vgl. Abb. 9) oder der Nachweis der Antikörperreaktivitäten erfolgt durch Inkubation mit Chromogen-Substrat-Lösung für die alkalische Phosphatase (Leary *et al.*, 1983), 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat-Kaliumsalz (BCIP) und 4-Nitroblau-Tetrazolium-Chlorid (NBT). Die alkalische Phosphatase setzt BCIP unter Oxidation und Dimerisierung zu einem blauen Indigofarbstoff um, wobei eine gleichzeitige Reduktion von NBT den purpurroten Farbstoff Diformazan ergibt. Diese Farbniederschläge lagern

sich an den Bindungsstellen der alkalischen Phosphatase am Antikörper an, zeigen damit die Reaktivität an und weisen das gesuchte Protein spezifisch nach.

2.3.2 Molekularbiologische Methoden

2.3.2.1 DNA-Extraktion aus dem Untersuchungsgut

Die DNA-Extraktion aus dem Pflanzenmaterial und Untersuchungsgut erfolgte in dieser Arbeit ausschließlich nach der CTAB-Methode (Lipp *et al.*, 1999). Das kationische Detergenz CTAB lysiert die Zellen im Untersuchungsgut und bindet störende Polysaccharide. Nach dem proteolytischen Verdau des Extraktes werden die restlichen Proteine mittels Chloroformextraktion entfernt. Die DNA wird anschließend aus dem vorgereinigten Extrakt mit Isopropanol (70 %) nach NaCl-Zusatz gefällt. Die präzipitierte DNA wird mit Ethanol gewaschen, zur Insertion der Restriktionsschnittstellen über Silika-Harz-haltige Säulen (QIAGEN, Hilden) gebunden und erneut gewaschen. Für den Einsatz der DNA in die PCR gemäß der Methode nach § 35 LMBG war eine Säulenreinigung nicht notwendig.

2.3.2.2 Methode zum Nachweis gentechnischer Veränderungen in glyphosatresistenten Sojabohnen gemäß § 35 LMBG

Der Nachweis der gentechnischen Veränderung von glyphosatresistenten Sojabohnen (*Glycine max*) wurde nach der Methode der Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren gemäß § 35 LMBG, L 23.01.22-1 „Für den Nachweis der gentechnischen Veränderung in glyphosatresistenten Sojabohnen und zur Identifizierung gentechnisch veränderter Pflanzen“, durchgeführt (vgl. 1.3.1 und 1.4). Diese Methode ermöglicht den spezifischen Nachweis des Konstruktes mit dem für die Resistenz gegenüber Glyphosat verantwortlichen Gen.

Hierbei wird zum Nachweis der gentechnischen Veränderung eine durch spezifische Primer (p35s-f2/petu r-1, vgl. 3.5) begrenzte Sequenz der aus den transgenen Sojabohnen extrahierten DNA mit Hilfe der PCR amplifiziert. Diese DNA-Sequenz umfasst den artifiziellen Übergang zwischen dem CaMV35S-Promotor und dem Chloroplasten Transit Peptid (CTP) (vgl. Abschnitt 2.2.4, sowie Abb. 7) und liefert ein Amplifikat der Größe 179 Bp. Die Anordnung dieser Gensequenzen ist spezifisch für die genetische Veränderung der glyphosat-toleranten Sojabohnen.

Die Kontrolle der Amplifizierbarkeit der aus den transgenen Sojabohnen extrahierten DNA erfolgt in einem Parallelansatz in der PCR mit einem Primerpaar (GM 03/04), mit

dessen Hilfe sich eine Sequenz aus dem Lektin-Gen der Sojabohne vervielfältigen lässt. Der Parallelansatz liefert ein Amplifikat der Größe 118 Bp (Vodkin *et al.*, 1983). Die PCR-Amplifikate werden im Anschluss auf die zu erwartende Größe durch elektrophoretische Auftrennung im Agarosegel überprüft. Durch geeignete Kontrollen wird sichergestellt, dass die amplifizierte DNA-Sequenz spezifisch für die genetische Veränderung und nicht durch Verunreinigungen während der verschiedenen Arbeitsschritte entstanden ist.

2.3.2.3 PCR

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) ist ein Verfahren, das 1987 von Kary B. Mullis entwickelt wurde und mit dem es möglich ist, *in vitro* von bestimmten Nucleotidsequenzen enzymatisch millionenfach Kopien zu erstellen (Saiki *et al.*, 1988). Bei dem als Amplifikation bezeichneten Vorgang synthetisiert eine DNA-Polymerase ausgehend von Startmolekülen (Primern) einen neuen DNA-Strang an einer einzelsträngigen Nucleinsäure-Matrize in aufeinanderfolgenden Zyklen exponentiell (Gassen *et al.*, 1999). Bei den Primern handelt es sich um kurze, einzelsträngige DNA-Sequenzen (18-22 Basen), die komplementär zu den vor und hinter dem ausgewählten DNA-Abschnitt liegenden DNA-Sequenzen sind und deshalb unter geeigneten Bedingungen daran binden können. Das Prinzip der PCR ist in Abbildung 10 dargestellt. Ein PCR-Zyklus beginnt mit der thermischen Denaturierung des DNA-Doppelstranges bei ca. 94 °C. Die beiden Primer (forward und reverse) hybridisieren an der komplementären

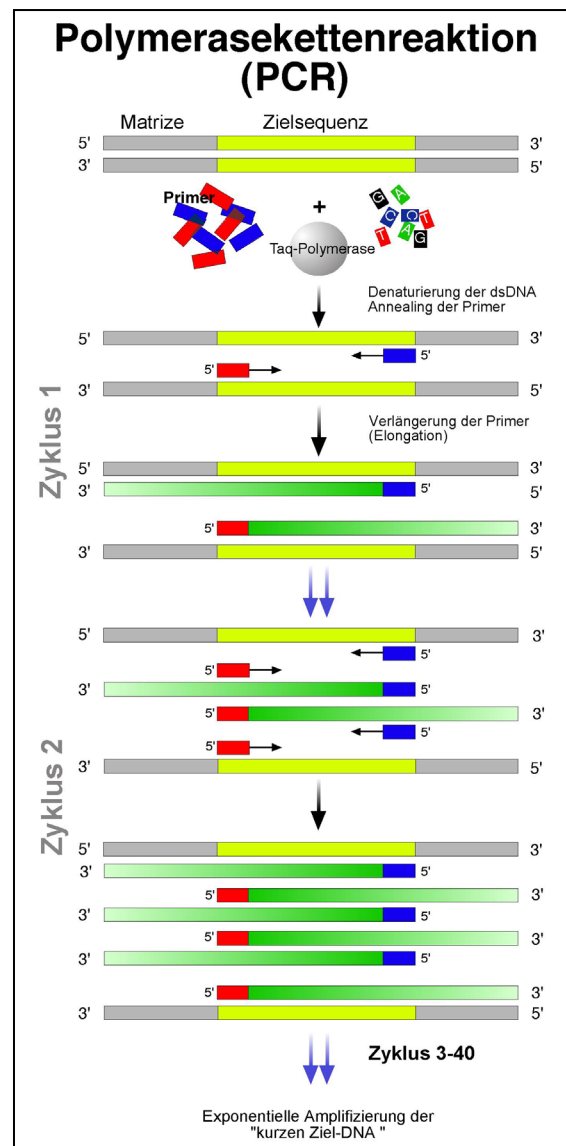


Abb. 10: Schematischer Ablauf einer PCR.

DNA-Matrize bei einer für sie optimierten Temperatur von ca. 50-70 °C. Im Anschluss erfolgt bei 72 °C die Synthese des von den Primern begrenzten Sequenzabschnittes von ihrem 3'-Ende aus, z.B. durch die hitzestabile *Taq*-Polymerase. Die Elongation durch die Polymerase erfolgt mit den im Mastermix vorhandenen Bausteinen (dATP, dTTP, dCTP und dGTP). Nach dem 3. Zyklus wird fast ausschließlich nur noch die Ziel-Sequenz gebildet, die durch die Position der Primer in der Originalmatrize festgelegt ist. Das entscheidende Prinzip der PCR ist die zyklische Wiederholung (20-40x) der einzelnen Reaktionsschritte, wodurch die Matrize exponentiell amplifiziert wird. Die in dieser Arbeit amplifizierten DNA-Abschnitte wurden gemäß ihrer Größe gegenüber Längenstandards im Agarosegel getrennt und mittels Etidiumbromid visualisiert. Zur Überprüfung der PCR-Reaktion wurde immer eine Positivkontrolle mitgeführt. Die verwendete DNA stammte sowohl aus rohen Sojabohnen als auch aus dem in Tabelle 1 aufgelisteten Untersuchungsgut. Für den Nachweis der GVO-Sojabohnen gemäß der Methode nach § 35 LMBG (vgl. 2.2.3) wurden die dort vorgeschriebenen Primer eingesetzt. Die Auswahl der Primer zur Insertion der Schnittstellen sowie zur Sequenzierung erfolgte mit dem Programm Mac Vektor™. Die Optimierung der PCR-Bedingungen, wie die Ermittlung der optimalen Annealing-Temperatur und der optimalen MgCl₂-Konzentration, fanden mit dem Mastercycler der Fa. Eppendorf statt. Zur Amplifikation wird in der Methode gemäß § 35 LMBG die *Taq*-Polymerase eingesetzt. Die Insertion der Schnittstellen in das Zielgen (1369 Bp, vgl. Abb. 27/28) zur Klonierung musste mit dem Expand 20 kb^{PLUS} PCR System der Fa. Roche erfolgen. Dieses System ist besonders geeignet, um größere Fragmente bis zu 20 kB zu amplifizieren. Durch den Einsatz eines Polymerasenmixes bestehend aus der *Taq* DNA Polymerase und der *Pwo* DNA Polymerase ist das verwendete System in der Lage, größere Fragmente mit einer geringeren Fehlerrate zu amplifizieren.

Die eingesetzte *Pwo* DNA Polymerase besitzt im Gegensatz zur *Taq* DNA Polymerase eine 3'-5' Exonuclease Aktivität (Proofreading-Polymerase), was in einer geringeren Fehlerrate von $8,5 \times 10^{-6}$ gegenüber der *Taq*-DNA Polymerase mit $2,6 \times 10^{-5}$ resultiert. Eine geringe Fehlerrate bei der PCR ist wichtig, um eine zum Template identische Nukleinsäuresequenz zu amplifizieren, da die Verschiebung des Leserahmens zu einem inaktiven oder fehlerhaften Protein bei der Expression führen kann.

2.3.2.4 Quantifizierung von gentechnisch veränderten Pflanzen in Lebensmitteln

Während der praktischen Arbeiten wurde am BgVV ein Real-time PCR Gerät der Fa. Applied Biosystems beschafft, so dass die Möglichkeit bestand, die Ergebnisse der bisher in der konventionellen PCR gemäß § 35 LMBG durchgeführten Versuche bzgl. der Anwesenheit von RR[®]-Soja auch mit einem automatisierten System in Anlehnung an diese Methode zu überprüfen.

Mit Inkrafttreten der Verordnung (EG) Nr. 49/2000 am 10.04.2000 wurde eine Kennzeichnungspflicht von Lebensmitteln festgelegt, die einen GVO-Anteil ab einem Schwellenwert von 1 % enthalten. Wird ein GVO-Anteil $< 1\%$ ermittelt und handelt es sich hierbei nicht um eine technische Verunreinigung, muss ebenfalls gekennzeichnet werden. Damit waren Nachweisverfahren gefordert, die über die bisherigen Möglichkeiten der qualitativen PCR hinausgingen. Zunächst wurde auf kompetitive PCR Systeme (Hübner *et al.*, 1999, 2001; Wurz *et al.*, 1999) mit internen DNA-Standards und visueller Auswertung zurückgegriffen, die aber seit Einführung der Real-time PCR für die Quantifizierung an Bedeutung verloren haben (Väitilingom *et al.*, 1999).

Bei der Real-time PCR Technologie wird der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (*fluorescence resonance energy transfer*, FRET, Cardullo, 1988) ausgenutzt. Hierbei lässt sich ein Fluoreszenzfarbstoff mit Licht einer bestimmten Wellenlänge (A1) anregen, der die aufgenommene Energie in Form von Licht einer anderen Wellenlänge (E1) emittiert. Bringt man ein Fluorochrom (Reporter) in ausreichende Nähe zu einem zweiten Fluorochrom (Quencher) wird die Energie statt als Licht der Wellenlänge E1 direkt an den Quencher weitergegeben, der folglich Licht der Wellenlänge E2 emittiert. Eine räumliche Trennung (E1) oder Nähe (E2) der beiden Fluorochrome wird in der Real-time PCR durch das Messen des emittierten Lichtes verfolgt.

Voraussetzung zur Anwendung dieser Technologie ist die Kombination eines computergesteuerten Thermocyclers, der ein integriertes lasergestütztes optisches Meßsystem enthält. Marktführend sind hier die Firmen Applied Biosystems mit der TaqMan[™]-Technologie (ABI[™] 5700, ABI[™] 7700) und Roche mit dem LightCycler[™] System.

Bei der in dieser Arbeit an einem ABI[™] 7700 verwendeten TaqMan[™] Technologie (Livak *et al.*, 1995) (vgl. Abb. 11) sind fluoreszenzmarkierte Reporter (5'-Ende, z.B. FAM, VIC) und Quencher (3'-Ende, z.B. TAMRA) auf einer sog. Sonde lokalisiert, die

sich zwischen den Primern auf dem zu amplifizierenden Abschnitt befindet. Primer und Sonde binden in der Annealingphase (Abb. 11 a) in der PCR spezifisch an die ssDNA und die Lichtemission (E1) ist gering, solange die Sonde als Ganzes erhalten bleibt. Der Reporter emittiert das von einem Laser induzierte Licht bei einer längeren Wellenlänge, das der Quencher nur absorbiert wenn er in räumlicher Nähe zum Reporter liegt (Abb. 11 b). In der Extensionsphase (Abb. 11 c) wird die Sonde durch die 5'-3'-Exonuclease-Aktivität der *Taq*-Polymerase abgebaut (Holland *et al.*, 1991), durch Bildung einer dsDNA in ihre Nucleotide gespalten und von der DNA abgelöst.

Der Reporter wird nun räumlich vom Quencher getrennt, so dass das Fluoreszenzsignal des Reporterfarbstoffes (E1) gemessen werden kann (Abb. 11 c + 11 d).

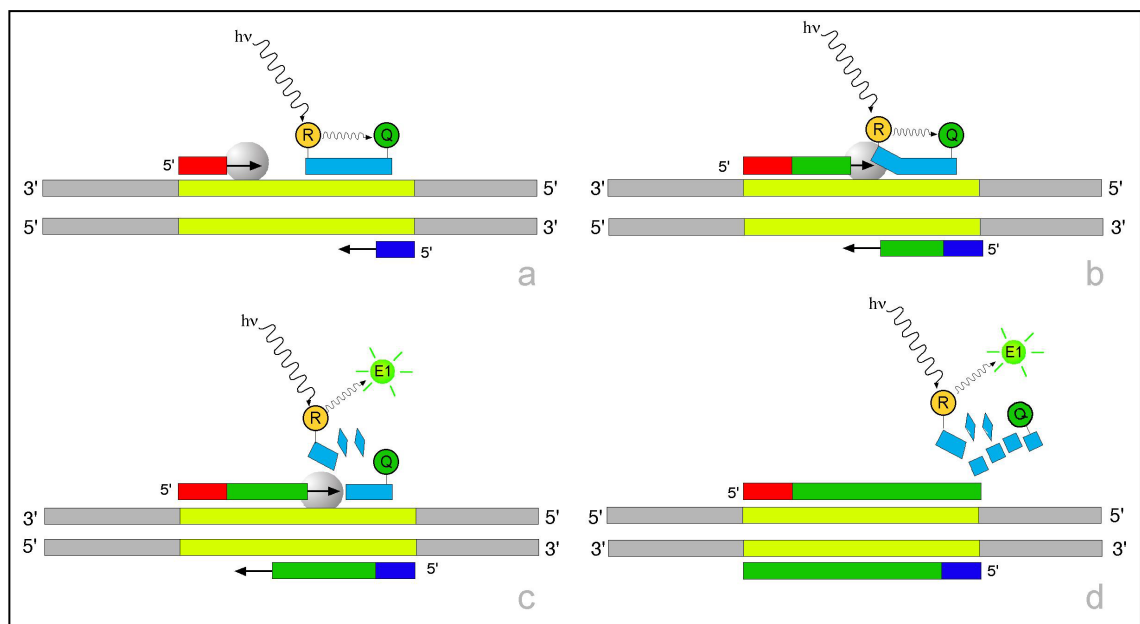


Abb. 11: Schematischer Ablauf der Detektion bei der TaqMan™ Technologie. a) Denaturierung der dsDNA und Annealing von Primer und Sonde. Eingestrahltetes Licht wird vom Reporter an den Quencher weitergeleitet. b) Elongation der Zielsequenz und Strang, Verdrängung durch die beginnende Hydrolyse der sequenzspezifischen Sonde durch die herannahende Polymerase. c) Extensionsphase, durch die Abspaltung des Reporters wird das Fluoreszenzsignal E1 gemessen. d) Die Polymerisation ist beendet, die Zunahme an Reportersignalen ist ein Maß für die Zunahme der DNA-Konzentration.

Mit steigender Zyklenzahl wird mehr DNA in der PCR synthetisiert, und mehr Reportermoleküle werden von ihren spezifischen Sequenzen abgespalten. Die Signalstärke steigt an, wobei die Emission der Reporter-Fluoreszenz direkt proportional zur Anzahl synthetisierter PCR-Produkte ist. Die Zunahme der Fluoreszenz während der PCR ist daher ein Maß für die Zunahme der DNA-Konzentration (PE Biosystems, 1999).

Die emittierte Fluoreszenz (FAM $\lambda = 518$ nm) wird über ein Linsen- und Spiegelsystem auf einen Spektrographen geleitet und mittels einer CCD-Kamera in ein digitales Signal umgewandelt. Die Fluoreszenzmessung erfolgt während der PCR für jede Probe online direkt im Reaktionsgefäß (Lorenz, 1998).

Der sogenannte Threshold Cycle (Ct-Wert) drückt hierbei die Zyklenzahl aus, bei der zum ersten Mal ein Anstieg der Reporter-Fluoreszenz (Übergang in die exponentielle Phase der PCR) über die Grundlinie (Threshold) erfasst wird. Daraus resultiert, dass je höher die Startkopienzahl ist, der Ct-Wert umso kleiner wird, da der Anstieg der Fluoreszenz eher beginnt. Durch die Ermittlung von Ct-Werten in Abhängigkeit der Zyklenzahlen lassen sich, ausgehend von bekannten Templatemengen, Standardreihen erstellen. Wichtigste Voraussetzung hierfür ist die Existenz von geeignetem Referenzmaterial zur Herstellung der Standards, da sonst keine reproduzierbare Quantifizierung möglich ist.

2.3.2.5 Expressionsvektoren

Zur Expression von DNA-Fragmenten muss das aus der PCR erhaltene Amplifikat zunächst in einen sog. Expressionsvektor kloniert werden. Hierzu wurden von der Fa. genexpress (Berlin) modifizierte Plasmide verwendet, die auf eine Entwicklung der pQE-Vektoren der Fa. QIAGEN (Hilden) zurückgehen. Bei der Expression wird das Protein als Fusionsprotein mit einem sogenannten "Histidin-Tag" in *E. coli* exprimiert. Die beiden verwendeten Plasmide unterscheiden sich in der Position des "Histidin-Tags", der bei pQE-90S C-terminal und bei pQE-100S N-terminal vorliegt. Die Plasmide (Abb. 12) besitzen ferner Schnittstellen (Sites) für die Restriktionsenzyme *Nde* I und *Nsi* I, über die es möglich ist, fremde DNA-Sequenzen in die Basenabfolge des Vektors zu integrieren. Das DNA-

Fragment wurde so konstruiert, dass am Anfang und Ende kompatible Schnittstellen für verschiedene Restriktionsenzyme vorhanden waren und das Fragment im richtigen Leseraster in die Vektoren kloniert werden konnte (Saiki *et al.*, 1988). Die Insertion der Schnittstellen erfolgte mittels PCR mit Proofreading

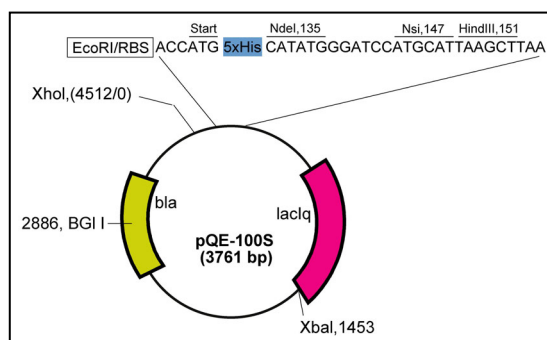


Abb. 12: Modifizierter Vektor mit His-Tag am N-terminalen Ende des zu klonierenden Proteins.

Polymerase (Expand 20 kb^{Plus} PCR System, siehe 2.3.2.3). Hierzu wurden Primer verwendet, die die Erkennungssequenz 5'-CATATG-3' für das Restriktionsenzym *Nde* I sowie die Erkennungssequenz 5'-ATGCAT-3' für das Enzym *Nsi* I besitzen. Um sicherzustellen, dass die Restriktionsenzyme schneiden, muss am 5'-Ende der jeweiligen Zielsequenz ein Basenüberhang von mind. 6 Basenpaaren bestehen. Das daraus resultierende Fragment besitzt eine Größe von 1369 Bp und wurde jeweils vor und hinter die Codons, die für 6 Histidinreste codieren, in den Vektor kloniert. Proteine mit mehreren Histidinresten besitzen eine starke Affinität zu Nickelionen. Diese Tatsache konnte zur Reinigung der Histidininfusionsproteine mittels Metallchelate-Affinitätsmatrices mit Ni-NTA (Nickel-Nitrilo-Essigsäure Harz)-Agarose (Hochuli *et al.*, 1987) eingesetzt werden.

2.3.2.6 Expression rekombinanter Proteine

Nach der Insertion der Ziel-DNA in den Vektor wurden die *E. coli* mit dem für die CP 4 EPSPS codierenden Plasmid mittels Elektroporation transformiert und in Flüssigkulturen inkubiert. Um die Basenabfolge des klonierten DNA-Fragmentes nach der Transformation über eine Sequenzierung zu überprüfen, erfolgte eine sog. Mini-Präparation, bei der die Vektoren aus den Bakterienzellen isoliert und die DNA und das Plasmid durch eine Restriktion erneut geschnitten werden. Wird die Ausgangssequenz bestätigt, kann mit der Gewinnung großer Mengen an Zielprotein begonnen werden.

Durch die Anwesenheit des *lac*-Promotors (vgl. Abb. 12) wird die Expression über die Zugabe von Isopropyl- β -D-Thiogalactosid (IPTG) in *E. coli* induziert. Die Anwesenheit des β -Lactamase Gens (*bla* I) verleiht dem Plasmid eine Resistenz gegenüber Ampicillin, die eine Wachstumsselektion der transformierten Klone auf ampicillinhaltigen Nährböden ermöglicht. Die Reinigung des rekombinanten His-Tagged CP4 EPSPS-Fusionsproteins erfolgte mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie (siehe 2.3.3.2) unter denaturierenden Bedingungen bei schrittweise fallendem pH-Wert (von pH 8/6,3/5,9 auf 4,5). Die Konditionierung der Ni-NTA-Säulenmatrix mit dem Zelllysate erfolgte mit 8 M Harnstoff und einem Guanidin-Hydrochlorid-haltigen Puffer. Das rekombinante Protein aus der Suspension wird durch die Ni-NTA Liganden retardiert, während alle anderen enthaltenen Bestandteile aufgrund fehlender Affinität nicht gebunden und als Säulendurchlauf verworfen werden.

2.3.2.7 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung in dieser Arbeit erfolgte gemäß der Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977) mit dem automatischen DNA-Sequenziergerät der Fa. Applied Biosystems, 310 Genetic Analyzer ABI Prism. Die Analyse im Sequenziergerät basiert auf der Detektion von fluorophor-markierten DNA-Fragmenten direkt im Gel nach Aktivierung mit einem Laser (Connell *et al.*, 1987; Ansorge *et al.*, 1987; Middendorf *et al.*, 1992). Werden vier verschiedene Fluorophore (Smith *et al.*, 1986) zur Markierung jedes der Didesoxynucleotide (Prober *et al.*, 1987; Lee *et al.*, 1992) benutzt, können die Reaktionen in einem Reaktionsgefäß ablaufen und in einer Gelspur analysiert werden.

Die gemessenen Signale werden durch eine Software gestützte Umwandlung als verschiedenfarbige Sequenzen dargestellt. Die zu sequenzierende DNA wurde mit dem Sequenzierungs Premix

gemäß dem Big Dye Terminator Protokoll nach Herstellerangaben (Applied Biosystems)

amplifiziert, dem pro Ansatz nur ein Primer (sense oder antisense) zugegeben wird. In

diesem Kit sind die enthaltenen 4 Didesoxynucleotide (ddNTPs, jeweils für A,T,G,C) mit unterschiedlichen Fluorophoren (Dichlororhodaminfarbstoffe) markiert. Der Premix enthält ein Gemisch aus

Desoxy- und Didesoxynucleotiden in Konzentrationen, die während der Synthese an jeder Nucleotidposition in der wachsenden Kette Didesoxynucleotide

anstelle von normalerweise eingebauten Desoxynucleotiden einbauen (vgl. Abb. 13). Der Kit enthält

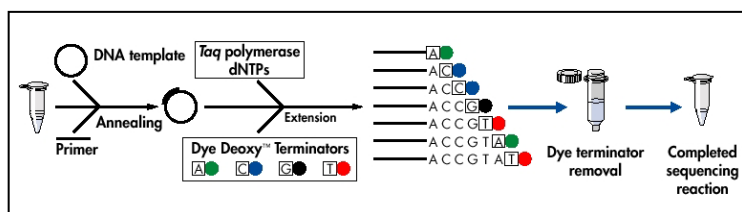


Abb. 13: Ablauf der Sequenzierungsreaktion nach dem Big Dye Terminator Protokoll. Die Markierung der DNA-Fragmente findet mit fluorophor-markierten ddNTPs statt (n. QIAGEN, 1998).

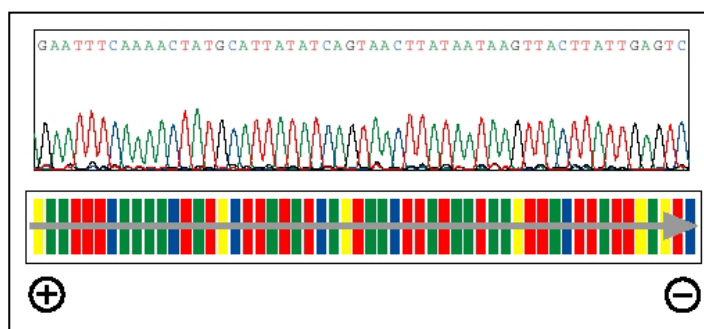


Abb. 14: Trennung der unterschiedlich markierten DNA im elektrischen Feld. Die verschiedenen Fragmente tragen als letzte Basen ddNTPs, die bei Bestrahlung mit einem Laser (488 nm) fluoreszieren und Licht einer bestimmten Wellenlänge abgeben. Die Energie der vier Wellenlängen wird parallel innerhalb einer Gelspur gemessen (modifiziert n. QIAGEN, 1998).

außerdem die AmpliTaq™ FS Polymerase (ABI), die eine höhere Affinität zu den Didesoxynucleotiden besitzt. Durch den Einbau der Didesoxynucleotide (ddNTPs, 3,5 Didesoxyribonucleinsäure) wird ein Abbruch der Polymerisation des DNA-Fragmentes bedingt, da aufgrund der fehlenden 3'-Hydroxygruppe kein weiteres Nucleotid mehr eingebaut werden kann. Die ddNTPs ersetzen in statistischer Verteilung die dNTPs und es entstehen verkürzte Stränge von unterschiedlicher Kettenlänge.

Das 5'-Ende eines jeden Fragments wird vom Sequenzierungsprimer gebildet, während das 3'-Ende aus dem Didesoxynucleotid besteht. Die überschüssigen dNTPs müssen nach der Sequenzierungsreaktion durch einen Fällungsschritt mit Ethanol und Säulenelution entfernt werden. Die Bandendetektion der fluorophor markierten DNA erfolgt bei der automatischen Sequenzierung mittels Kapillarelektrophorese in einem Polyacrylamidgel im Genetic Analyzer. Während der Gelelektrophorese in nur einer Gelspur trennen sich die DNA-Fragmente nach ihrer Größe auf und werden innerhalb der Kapillare durch die Anregung mit einem Laser (488 nm) und der Messung der unterschiedlichen Transmission parallel detektiert (vgl. Abb. 14). Nach dem Übereinanderlegen der Emissionskurven wird über die Ermittlung der Maxima die Basenreihenfolge festgestellt. Mit diesem System sind parallel 48 Ansätze detektierbar. Die Auswertung der Rohdaten erfolgt mit dem Programm Sequencing Analysis von ABI. Der Vergleich verschiedener Sequenzen erfolgt mit dem Programm Sequence Navigator™ von ABI.

2.3.3 Reinigung der Antiseren

Um die polyklonalen Antikörper aus dem Kaninchenserum von anderen Serumbestandteilen abzutrennen, wurde zunächst eine Ammoniumsulfatfällung und anschließend eine spezifische Proteinabtrennung mittels Affinitätschromatographie durchgeführt.

2.3.3.1 Ammoniumsulfatfällung

Die Ammoniumsulfatfällung wurde zur Anreicherung der Immunglobuline und Abtrennung des Albumins aus dem Serum durchgeführt. Das Ausfällen der Proteine wird erreicht, in dem die Salzkonzentration der wässrigen Umgebung so stark verändert wird, dass Wechselwirkungen zwischen Protein und Lösungsmittel nicht mehr möglich sind (Cooper, 1981). Dies wird durch die Zugabe einer starken Konzentration an kleinen, hochgeladenen Ionen wie Ammonium oder Sulfat möglich. Beim Lösen von Ammoniumsulfat wird eine große Anzahl von Wassermolekülen pro

Ammoniumsulfatmolekül gebunden. Je mehr Ammoniumsulfat in der Lösung vorhanden ist, desto weniger Wasser steht für die Wechselwirkungen mit den Proteinen zur Verfügung. Die Löslichkeit sinkt, und die Proteine fallen aus.

2.3.3.2 Affinitätschromatographie

Bei der Affinitätschromatographie handelt es sich um die reversible, kovalente Bindung z.B. eines Proteins aus einer zu reinigenden Lösung an einen sehr spezifischen Liganden. Das Prinzip der AC ist in Abbildung 15 dargestellt. Der Ligand (CP4 EPSPS) befindet sich an eine Gel-Matrix gekoppelt und tritt mit der zu reinigenden Probe in Wechselwirkung. Ist das Antigen immobilisiert, wird die Probensubstanz, die den zu

isolierenden Antikörper enthält, aufgegeben und die Antikörper selektiv aus dem Kaninchenserum von den restlichen Serumbestandteilen getrennt (1). Bei milden Bedingungen (physiologische Salzkonzentration, physiologischer pH-Wert) erfolgt die Ausbildung einer Antigen-Antikörperbindung (2). Ist dies quantitativ erfolgt, wird die Antigen-Antikörperbindung durch Veränderung der Bedingungen (Erhöhung der Salzkonzentration, Absenkung des pH-Wertes)

gelöst und das zu isolierende Antigen desorbiert (3) (Lowe und Dean, 1974). Als Kopplungsmatrix wurde NHS (N-Hydroxysuccinimid; Van Sommeren *et al.*, 1993) aktivierte Fast Flow Sepharose eingesetzt, die in der Lage ist, Liganden schnell und effektiv zu binden. Während des Kopplungsschrittes bilden deren Aminogruppen mit dem Liganden bei einem möglichst basischen pH-Wert stabile primäre Amine. Weitere Bindungsstellen wurden nach der Kopplung mit Ethanolamin abgesättigt. Die Reinigung und Elution des Antiserums wurde mit der beschriebenen Affinitätssäule im automatisierten Äkta Explorer System der Firma Amersham Pharmacia Biotech durchgeführt.

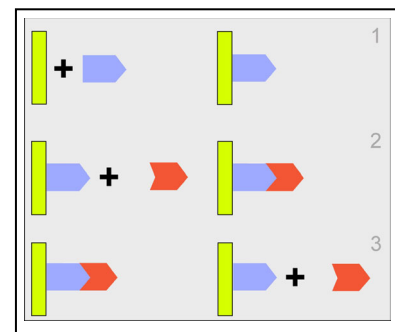


Abb. 15: Schematische Darstellung einer Affinitätschromatographie.

2.3.4 Überprüfung der Antiseren nach der Affinitätschromatographie

Die durchgeführte Reinigung der Antiseren wurde mittels PAGE (siehe 3.3.3) überprüft. Dazu wurden die Seren vor und nach der Affinitätschromatographie elektrophoretisch getrennt und Banden mittels Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Die Überprüfung der Spezifitäten erfolgte im Immunoblot wie unter 3.3.6.2 beschrieben.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

6-Aminohexansäure $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_5\text{COOH}$	Sigma, St. Louis, USA
Albumin Fraktion V (BSA)	Merck, Darmstadt
Acrylamid rotiphoese Gel 30	Roth, Karlsruhe
Agarose LE	Roche, Mannheim
Aktivkohle	Merck, Darmstadt
Ammoniumsulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Merck, Darmstadt
AuroDye	Amersham, Bioscience, Buckinghamshire, England
Ammoniumpersulfat	Millipore, Bedford, USA
Bisbenzimid H 33258	Sigma, St. Louis, USA
5-Brom-4-Chlor-3-indolylphosphat-Kaliumsalz	Sigma, St. Louis, USA
Borsäure	Sigma, St. Louis, USA
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Citronensäure, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blue R-250	Merck, Darmstadt
Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
1,4 Dithiothreit, $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$	Sigma, St. Louis, USA
Dikaliumhydrogenphosphat, K_2HPO_4	Merck, Darmstadt
Essigsäure 100 %, CH_3COOH	Merck, Darmstadt
Ethanol 96 % vergällt, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, Titriplex® III)	Merck, Darmstadt
Glycerin 87 %, $\text{C}_3\text{H}_5(\text{OH})_3$	Merck, Darmstadt
Glycin, $\text{H}_5\text{C}_3\text{NO}_2$	Merck, Darmstadt
Guanidin-Hydrochlorid	Fluka AG, Buchs, Schweiz
Harnstoff	Sigma, St. Louis, USA
IPTG	Roche, Mannheim
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat, KH_2PO_4	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid, KOH	Merck, Darmstadt
Kupfersulfat, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Sucofin, Trade Service Intenational
Magnesiumchlorid $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt
Methanol 100 %, CH_3OH	Merck, Darmstadt
4-Nitroblautetrazoliumchlorid	Serva, Heidelberg
Natriumacetat, $\text{CH}_3\text{COONa} \times \text{H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid, NaCl	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid, NaOH	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat	Serva, Heidelberg
2-Propanol, $\text{C}_3\text{H}_7\text{OH}$	Merck, Darmstadt
para-Nitrophenolphosphat	Merck, Darmstadt
Pyronin Y	Sigma, St. Louis, USA
Schwefelsäure 95-97 %, H_2SO_4	Merck, Darmstadt

Saccharose	Merck, Darmstadt
Salzsäure, 25 %	Merck, Darmstadt
NHS-activated Sepharose® 4 Fast Flow	Amersham Pharmacia Biotech Uppsala, Schweden
TEMED, C ₉ H ₁₆ N ₂	Millipore, Bedford, USA
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, C ₄ H ₁₁ NO ₃	Merck, Darmstadt
Tween 20	Fluka AG, Buchs, Schweiz
Xylencyanol	Merck, Darmstadt
H ₂ O _{dest.}	Fluka AG, Buchs, Schweiz

3.1.2 Antikörper / Antiseren / Enzyme

Alkalische Phosphatase konjugiertes Ziege-anti-Maus (IgG + IgM) Serum	Dianova, Hamburg
Alkalische Phosphatase konjugiertes Ziege-anti-Kaninchen (IgG + IgM) Serum	Dianova, Hamburg
Ampli-Taq™ Gold Polymerase	Applied Biosystems, Foster City, USA
Monoklonaler Antikörper anti EPSP-Synthase	TNO, Nutrition and Food, Niederlande
<i>Nde</i> I (Restriktionsenzym)	New England Biolabs, Beverly, USA
<i>Nsi</i> I (Restriktionsenzym)	New England Biolabs, Beverly, USA
Polyklonales Kaninchenserum anti EPSP-Synthase	Bcd, Berlin
<i>Pwo</i> DNA Polymerase	Roche, Mannheim
Uracil-N-Glycosylase, heat labile	Roche, Mannheim

3.1.3 Fertigreagenzien / Kits

310 Genetic Analyzer Buffer 10x mit EDTA	Perkin Elmer, Foster City, USA
Calf Thymus DNA	Sigma, St. Louis, USA
Coomassie-Protein Reagent	Pierce, Rockford, Illinois, USA
dNTPs (A/C/T/G/UTP-Lsg.)	Perkin Elmer, Foster City, USA
Ethidiumbromid-Lsg.	Merck, Darmstadt
Expand 20 kb ^{plus} PCR System	Roche, Mannheim
HiTrap Protein A	Amersham Pharmacia Biotec
India Ink	Pelikan, Hannover
Jet Sorb, (DNA cleaning Kit)	Machery-Nagel, Düren
Ni-NTA-Agarose	QIAGEN, Hilden
NucleoSpin	Machery-Nagel, Düren
QIAGEN Reinigungssäulen	QIAGEN, Hilden
QIAquick Gel Extraktionskit	QIAGEN, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN, Hilden
ReadyRed™ (Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch)	Appligene, Illkirch, Frankreich
Sequenzierungs-Premix	Applied Biosystems, Foster City, USA
Magnesiumchlorid-Lsg. (MgCl ₂)	Perkin Elmer, Foster City, USA
Gene Amp 10x PCR-Puffer	Perkin Elmer, Foster City, USA

3.1.4 Marker und „DNA-Leitern“

LMW – Marker (14,4 - 97,4 kDa)	Bio-Rad, Hercules, USA
DNA-Leiter 50 Bp	Life technologies, Paisley, United Kingdom
DNA-Leiter 100 Bp	Life technologies, Paisley, United Kingdom
DNA Molecular Weight Marker III	Roche, Mannheim
DNA Molecular Weight Marker VIII	Roche, Mannheim

3.1.5 Primer und Sonden, bezogen durch TIBMOBBIOL (Berlin)

Primer zur Insertion der Restriktionsschnittstellen Nde I/Nsi I (Primerextension)

Jan-1-f 5'-CCg ATC CAT ATg CTT CAC ggT gCA AgC AgC-3' (Nde I)
 Jan-2-r 5'-TgC ACT ATg CAT ggC AgC CTT CgT ATC ggA-3' (Nsi I)

Primer für den Lektin-Nachweis in Sojabohnen

GM03 5'-gCC CTC TAC TCC ACC CCC ATC C-3'
 GM04 5'-gCC CAT CTg CAA gCC TTT TTg Tg-3'

Primer für den spezifischen Nachweis von RRTM-Sojabohnen

p35s-f2 5'-TgA TgT gAT ATC TCC ACT gAC g-3'
 petu-r1 5'-TgT ATC CCT TgA gCC Atg TTg T-3'
 RR01-r 5'-Tgg CgC CCA Tgg CCT GCA Tg-3'
 RR02-f 5'-CCT ATC CCT TgA gCC Atg TTg T-3'
 RR04-f 5'-CCC CAA gTT CCT AAA TCT TCA AgT-3'
 RR05-r 5'-TGC ggg CCg gCT gCT TgC A-3'

Primer zur Sequenzierung des CP4 EPSPS-Gens

EPSPS3-f 5'-TAA ggA Agg Cga CAC CTg g-3'
 EPSPS25-r 5'-TTC AgC gTg gAg gAg CgA AC-3'
 EPSPS7-f 5'-TCT TCC CgT TAC CTT TgC g-3'
 EPSPS24-r 5'-gCA gCA TCT TTT TCC gTA Tg-3'
 EPSPS8-f 5'-ATC ATA Cgg AAA AgA TgC Tg-3'
 EPSPS23-r 5'-TAA Cgg gAA gAC ggT CAC-3'
 EPSPS9-f 5'-TTC gCT CCT CCA CgC TgA Ag-3'
 EPSPS21-r 5'-Agg TgT CgC CTT CCT TAC g-3'
 EPSPS13-f 5'-TCg TgT Cgg AAA ACC CTg-3'
 EPSPS29-r 5'-ACA ggg TTT TCC gAC ACg-3'

Primer zur Plasmidsequenzierung

pQE-100-f 5'-Cgg ATA ACA ATT TCA CAC Ag-3'
 pQE-100-r 5'-gTT CTg Agg TCA TTA Ctg g-3'

TaqManTM-Primer und Sonden

GM1-F 5'-CCA gCT TCg CCg CTT CCT TC-3'
 GM1-R 5'-gAA ggC Aag CCC ATC TgC Aag CC-3'
 RR1-F 5'-CAT TTg gAg Agg ACA CgC TgA-3'
 RR1-R 5'-gAg CCA TgT TgT TAA TTT gTg CC-3'
 GM1 Sonde 5'-6FAM-CTT CAC CTT CTA TgC CCC TgA CAC T-Tamra-3'
 RR1 Sonde 5'-6FAM-CAA gCT gAC TCT AgC AgA TCT TTC-Tamra-3'

3.1.6 Organismen/Vektoren

Escherichia coli, Stamm DH5 α ,

Invitrogen, Karlsruhe

Genotype: F ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169

deoR recA1 endA1 hsdR17(r_k⁻, m_k⁺) phoA supE44

λ *thi-1 gyrA96 relA1*

Vektor pQE-90S/pQE-100S modifiziert nach QIAGEN

Genexpress, Berlin

3.1.7 Verbrauchsmaterialien

Achtkanalschalen	Bio-Rad, Hercules, USA
Dialyeschläuche SnakeSkin (Molecular weight cut off 10.000)	Pierce, Rockford, Illinois, USA
Durapore (PVDF) Membran Filter	Millipore, Bedford USA
Einmalspritzen, 20/40 mL	NUNC, Nalge , Rochester, New York USA
Filterpapierscheiben (0,025 µm Typ VS)	Millipore, Bedford USA
Filterpapier, fusselfrei 1574	Schleicher & Schuell, Dassel
Filtertips, 2,5 µL, 10 µL, 100 µL, 1000 µL	Eppendorf, Hamburg
Jet Sorb	Machery-Nagel
Mikrotiterplatten, Immuno Plate F96 MaxiSorp™	NUNC, Nalge , Rochester, New York USA
Multi Ultra Tubes® 0,2 mL	Roth, Karlsruhe
Nitrocellulose-Membran, 0,2µm Protran	Schleicher & Schuell, Dassel
Papierfilter, 595.1/2	Schleicher & Schuell, Dassel
PCR Reaktionsgefäße Mikro Amp	Applied Biosystems, Foster City, USA
PCR Reaktionsgefäße Mikro Amp	Applied Biosystems, Foster City, USA
Reaktionsgefäße 0,5 mL, 1,5 mL, 2 mL	Eppendorf, Hamburg
Sterilfilter V115; 0,45 µm	Sartorius, Göttingen
Tesafilm	tesafilm, Hamburg
Zentrifugen-Filtereinheiten, Centricon (YM 10)	Amicon, Beverly MA, USA
Zentrifugen-Filtereinheiten, Centricon Plus 20 (PL 10)	Amicon, Beverly MA, USA
Zellglas/Einmachfolie	folia

3.1.8 Geräte

Autoklav	Varioklav 500 EV-Z	H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
Blotting-Elektroden	Fast Blot B33	Biometra, Göttingen
Digitalkamera		Biostep, Jahnsdorf
Elektrophoresekammer I	Mighty Small II, Se 250	Amershan Bioscience, Freiburg
Elektrophoresekammer II	Bio-Smart	
Elektroporator	EC 100	Aparatus Coporation, USA
Elisa-Reader	MRX	Dynatech Laboratories
Feinwaage	BP 210 S	Sartorius, Göttingen
Fluorometer	Hoefer DyNA Quant™ 200	Amershan Bioscience, Freiburg
Chromotographie System	ÄktaExplorer	Amershan Bioscience, Freiburg
Gelgießrahmen	Hoefer Mighty Small Dual Gel Caster/ Hoefer Mighty Small Multi Gel Caster	Amershan Bioscience, Freiburg
Gekühlte Tischzentrifuge	Centrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Heizblock	Reacti-Therm	Rockford, Illinois, USA
Kreisschüttler	Phero-Shaker 13A34	Biotec-Fisher, Reiskirchen
Mikrowelle		Bosch, Stuttgart
pH-Meter	766 Calimatic	Knick, Berlin
Phoretix	Foto-Dokumentationsprogramm	Biostep, Jahnsdorf
Präzisionswaage	PM 2000	Mettler Toledo, Columbus, USA
Probenrüttler	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Real-time PCR System	7700 Sequence Detector	Applied Biosystems, Foster City, USA
TaqMan™ Technologie		
Sequenzierungsautomat	310 Genetic Analyzer, ABI Prism	Applied Biosystems, Foster City, USA

Sequencing Analysis	Version 3.0	Applied Biosystems, Foster City, USA
Sequence Navigator	Version 1.0.1	Applied Biosystems, Foster City, USA
MacVector™	Version 6.5.3	Oxford Molecular Ltd.
Stromquelle	EPS 1001	Amershan Bioscience, Freiburg
Stromquelle	EPS 3500 XL Multitemp II	Amershan Bioscience, Freiburg
Thermocycler	Trio-Thermoblock	Biometra, Göttingen
	GeneAmp 2400	Perkin Elmer, Foster City, USA
	Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg
UV-Tisch		Biometra, Göttingen
Wipp-Tisch	Rocky	Fröbel Labortechnik, Lindau
Vakuum-Konzentrator	Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg

3.1.9 Untersuchungsmaterialien

Untersuchungsmaterial in Form von Sojabohnen *Glycine max*, sowohl die, die das neu eingeführte Konstrukt Lot-Nr. 30/1 (RR®-Soja) als auch Kontrollbohnen Lot-Nr. 20/1, die dieses Konstrukt nicht enthielten, wurden freundlicherweise von der Fa. Monsanto zur Verfügung gestellt. Sojamehl mit einem Gehalt an 100 % RR®-Soja, Mischungen aus Soja- und Maismehlen mit definierten Anteilen an RR®-Soja und Kontrollbohnen sowie Texturiertes Vegetables Protein (TVP) aus RR®-Soja und Kontrollbohnen wurden durch die Fa. Limagrain in Frankreich bezogen. Tofu mit definierten Anteilen (0 %, 1 %, 2 %, 4 %, 100 %) an RR®-Soja wurde im BgVV im Labormaßstab hergestellt. Zertifiziertes Referenzmaterial (CRM) in Form von Mehlen mit definierten Anteilen RR®-Soja (0 %, 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 2 %, 5 %) wurde von der Fa. Fluka bezogen. Nähere Informationen zu diesem Referenzmaterial, hergestellt vom European Commission's Joint Research Center (JRC, IRMM, Geel), liefert Pauwels (1999). Fertigprodukte, Sportler-, Diät- und Sondennahrung (vgl. Tab. 1) wurden über das Internet recherchiert http://www.greenpeace.de/GP_SYSTEM/1QNTIPF6.HTM und von den dort gelisteten Herstellern direkt bezogen.

Tab. 1: Verwendete Untersuchungsmaterialien mit ihrer Verkehrsbezeichnung.

Bezeichnung	Hersteller	Gehalt an RR®-Soja in %
Sojabohnen Lot-Nr. 20/1	Monsanto	0 %
Sojabohnen Lot-Nr. 30/1	Monsanto	100 %
Sojamehl (CRM, 0-5 %)	Fluka, Limagrain	0 %, 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 2 %, 5 %, 100
Tofu	BgVV	0 %, 1 %, 2 %, 5 %, 100 %
Diät-Riegel Amaretto	GfGE, Gesellschaft zur Gewichtsreduktionsschulung	k.A.
Diät-Riegel Rum	GfGE, Gesellschaft zur Gewichtsreduktionsschulung	k.A.
Power Play Eiweißriegel	Novartis Nutricion GmbH	k.A.
Ägyptischer Riegel		k.A.

Veget. Grillwürstchen	vital	k.A.
Getränkepulver Formula 1, Schokolade	Herbalife	k.A.
Sondennahrung, Nutricomp	Braun	k.A.
Soja-Schnitzel	Zonnatura Vollwertkost	k.A.
TVP	Limagrain	2 %; 100 %
GVO-Ölsaaten-Mischungen; Mix A; Mix B	Limagrain	<u>Mix A:</u> 49 % Maismehl, 1 % Bt-176-Maismehl, 50 % RR-Soja <u>Mix B:</u> 50 % Bt-176-Maismehl, 49 % Maismehl, 1 % RR-Soja
Almased	Almased GmbH	k.A.
Sojagen, pflanzliche Sojanahrung	GranoVita, neuform	k.A.
Slim Fast	Sun Nutritional Inc.	k.A.
Mexico-Fix, fleischlose Taco-Füllung	Sobie	k.A.

k.A. = keine Angaben

3.1.10 Wässrige Proteinextrakte für Kreuzreaktivitätsuntersuchungen

Zur Untersuchung von Kreuzreaktivitäten wurden Extrakte verschiedener Leguminosen und weitere in Lebensmitteln verwendete Bestandteile mit den polyklonalen Kaninchenserum inkubiert. Die verwendeten Extrakte wurden freundlicherweise vom Paul-Ehrlich-Institut (PEI), Arbeitsgruppe Prof. Dr. Vieths in Langen zur Verfügung gestellt.

Extraktionspuffer

25 mM Tris-Tricine, Calciumlactat, pH 8,6

Extraktionsbedingungen

- 50 mg Einwaage, Zugabe von 1 mL Extraktionspuffer
- Inkubation bei 45 °C, 1 Stunde
- Zentrifugation 1000 rpm

3.2 Versuchsdurchführungen

3.2.1 Tofu-Herstellung

Die rohen Sojabohnen wurden kalt abgespült, über Nacht gequollen und am folgenden Tag mit 750 mL Wasser in einem Blender zu feinem Püree verarbeitet. Zur Entbitterung des Sojabreis wurde 1 L Wasser zum Kochen gebracht, das Püree beigemischt und bei mittlerer Hitze ca. 10 min unter ständigem Rühren gekocht. Das Püree wurde im Anschluss durch ein Baumwolltuch über einem Sieb filtriert und das Filtrat in einem Becherglas aufgefangen. Der Sojarückstand wurde mit 250 mL kaltem Wassers vermengt und erneut ausgepresst. Die gewonnene Sojamilch wurde zur Tofuherstellung in ein kalt ausgespültes Gefäß gegeben und bis kurz vor dem Siedepunkt erhitzt. Das Gefäß wurde von der Wärmequelle entfernt und das Gerinnungssalz Nigari (CaSO_4) in flüssiger Form in drei Arbeitsschritten unter kräftigem Rühren unter die Milch gegeben (Behlitz und Grosch, 1992). Die Milch wurde im Anschluss für je ca. 3 min ruhen

gelassen. Da die Milch von unten nach oben gerinnt, wurde das zweite Drittel des Gerinnungssalzes nur vorsichtig an der Oberfläche eingerührt. Nach 3 min Ruhe wurde das restliche Drittel des Gerinnungssalzes vorsichtig in die Milch gerührt und der Ansatz stehen gelassen, bis deutliche Proteinflocken erkennbar waren. Nach ca. 30 min nach Erreichen der richtigen Konsistenz wurde der Tofu in Form gepresst. Das überschüssige Wasser wurde durch erneutes Filtrieren mit Baumwolltüchern abgetrennt. Dies gab dem Tofu seine Form. Der Tofu wurde portioniert und ist tiefgefroren mind. 3 Monate haltbar.

Sojamilch

100 g Sojabohnen Trockengewicht
ad 1L frisches Wasser

Tofu

3 g CaSO_4 /kg Sojamilch
à 3 Portionen zugeben

3.3 Biochemische Methoden

Zur Ermittlung der optimalen Extraktionsmethode wurden im Laufe dieser Arbeit verschiedene Puffer zur Extraktion und Verhältnisse zwischen der Probe und dem Extraktionsmittel überprüft. Die verwendeten Puffer unterschieden sich in ihrer Zusammensetzung, im pH-Wert und in der Ionenstärke.

3.3.1 Proteinextraktion

Die Sojabohnen wurden über Nacht zum Quellen in ein Becherglas mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ gegeben. Zur Extraktionsvorbereitung wurden die Sojabohnen am nächsten Tag gehäutet und der Keimling entfernt. Im Anschluss wurde jeweils 1 Bohne zu ca. 100 mg oder anderes Untersuchungsgut (zu je 100 mg) in ein 1,5 mL Eppendorfgefäß gegeben, mit einem Pistill zerkleinert und nach Zugabe von 1 mL Extraktionspuffer 1h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde bei 15 °C und 16.000 rpm 30 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand nach dem Durchstechen der aufliegenden Fettschicht abgenommen und in neue Eppendorfgefäße überführt. Die so gewonnenen Extrakte waren sofort zu weiteren Untersuchungen einsetzbar. Um ungelöste Stoffe zu entfernen bzw. trübe Überstände zu klären, konnte zusätzlich durch ein 0,45 µm Membranfilter (NC-Acetate) filtriert werden.

wässriger Auszug

$\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ 1 mL

Material und Methoden

0,01 M PBS-Puffer, pH 7,4

NaCl	80 g
KH ₂ PO ₄	2 g
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	35,60 g
KCl	2 g
ad 1000 mL H ₂ O _{dest.}	

Tris/Tricine-Puffer 0,025 M, pH 8,6

0,16 M Tris	39,2 g
0,05 M Tricine	17,9 g
Calciumlactat	1,16 g
ad 1900 mL H ₂ O _{dest.} , pH 8,6 mit HCl (10 %) einstellen ad 2000 mL mit H ₂ O _{dest.} 50 mL Puffer mit 50 mL H ₂ O _{dest.} mischen → 0,025 M Tris/Tricine-Puffer (pH 8,6)	

Borat-Puffer (Padgett, 1995)

100 mM Tris	1,211 g
100 mM Na-Borat	2,0122 g
5 mM MgCl ₂	101,65 mg
0,05 % Tween	50 µL
0,2 % Natriunascorbat	2 mL einer 10%igen Lösung
ad 100 mL H ₂ O _{dest.}	

Extraktionspuffer nach TNO

63 mM Tris	6,3 mL Sammelgelpuffer
2 % (w/v) SDS	10 mL (10 %) SDS-Lösung
20 % (w/v) Glycerin	10 mL Glycerin (100 %)
1 % DTT	500 mg
0,01 % Bromphenolblau	1 mg
ad 50 mL H ₂ O _{dest.} auffüllen, aliquotieren zu 1 mL	

3.3.2 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Extrakte erfolgte mit dem „Coomassie Protein Assay Reagent“ Fertigreagenz der Firma Pierce (Bradford, 1976) nach der Standard Assay Procedure auf Mikrotiterplatten. Eine BSA Lösung (Albumin Fraktion V) ausgehend von 1 mg/mL diente durch Reihenverdünnung zur Erstellung einer Eichgeraden von 0,125 mg/mL - 1 mg/mL. Zur Ermittlung des Proteingehaltes der Lösungen wurden 10 µL Probe mit 300 µL Reagenz versetzt und bei $\lambda = 595$ nm im ELISA-Reader gegenüber einem Leerwert aus Wasser und Fertigreagenz gemessen.

3.3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese / Coomassie-Färbung

Die Auftrennung der gewonnenen Proteinextrakte erfolgte unter reduzierenden Bedingungen nach der Methode von Laemmli, (1970). Als Trennungsmatrix wurden 10 x 8 cm große und 0,75 cm dicke PAA-Gele verwendet. Die PAA-Konzentration des Pyronin Y markierten Sammelgels betrug 5 %, die des nachfolgenden Trenngels 12,5 %. Die aufgetragene Proteinmenge variierte je nach Fragestellung zwischen 7 µg–30 µg Gesamtprotein pro 0,5 cm Geltasche bei analytischen Gelen. Präparative Gele bestanden aus einer Probentasche mit 6,8 cm Breite (Auftragsmenge 5-12 µg/Slot) und wurden zur weiteren Verwendung für Immunoblot-Untersuchungen angefertigt. Die Elektrophorese wurde mit einer Laufzeit von 1 h mit einer konstanten Stromstärke von 20 mA pro Gel durchgeführt. Die Proben wurden vor der Auftragung mit 5x Probenpuffer 1:5 versetzt und 5 min bei 95 °C erhitzt. Als Molekularmassenstandard diente ein Proteingemisch bekannter Zusammensetzung von Bio Rad mit Vergleichsproteinen zwischen 14,4-97,4 kDa (LMW).

Zur Darstellung aller getrennten Proteine erfolgte nach der Elektrophorese die Anfärbung mit Coomassie-Färbelösung und ein Trocknen der Gele oder eine immunologische Detektion ausgewählter Proteine nach Transfer auf NC-Membranen (Westernblot).

Tab. 2: Zusammensetzung der verwendeten Sammel- und Trenngele.

	5%iges Gel	12,5%iges Gel (2 Gele)
H ₂ O _{dest}	8,45 mL	4,8 mL
Acrylamid	2,55 mL	6,25 mL
Trenngelpuffer	-	3,75 mL
Sammelgelpuffer	3,75 mL	-
Pyronin Y	16 µL	-
SDS (10 %) (w/v)	150 µL	150 µL
TEMED	20 µL	5 µL
APS (10 %) (w/v)	90 µL	75 µL
Summe	15 mL	15 mL

Trenngelpuffer, 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)

1,5 M Tris 90,855 g Tris
ad 400 mL H₂O_{dest.}, pH 8,8 mit HCl_{konz.}
einstellen, ad 500 mL mit H₂O_{dest.}

5x Probenpuffer, reduzierend

0,5 M Sammelgelpuffer 5 mL
Glycerin 87%ig (w/v) 5 mL
DTT Lösung 50%ig (w/v) 1 mL
SDS Lösung 10%ig (w/v) 5 mL
Bromphenolblau

mischen und aliquotieren, bei -18 °C lagern

Sammelgelpuffer, 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)

0,5 M Tris 30,285 g Tris
ad 400 mL H₂O_{dest.}, pH 6,8 mit HCl_{konz.}
einstellen, ad 500 mL mit H₂O_{dest.}

10x Elektrophoresepuffer (Stammlösung)

0,25 M Tris 60,58 g
3,8 M Glycin 288,26 g
10 % (w/v) SDS 20 g
ad 2000 mL H₂O_{dest.}

Coomassiefärbung nach Righetti und Drysdale (1974)

Lösung A	Lösung B
3,9 g CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,25 g Coomassie-Brilliant-Blue R-250
ad 325 mL H ₂ O _{dest.}	ad 125 mL Isopropanol/50 mL Eisessig
-Lösung A und B vermischen	

Entfärbelösung

18 % (v/v) Isopropanol	180 mL
9 % (v/v) Eisessig	90 mL
ad 1000 mL H ₂ O _{dest.}	

3.3.4 Semi-dry Blotting

Die NC-Membran und das Gel wurden zur Vorbereitung für den Transfer nach der Elektrophorese 10 min in Anodenpuffer II äquilibriert. Der Proteintransfer erfolgte in einer Semi-Dry-Blotting-Apparatur und wurde für eine Dauer von 40 min bei einer Stromstärke von 0,8 A/cm² (100 - 200 mA) durchgeführt. Je 3 Filterpapiere für die anodische Seite wurden in Anodenpuffer I + II getränkt, für die kathodische Seite wurden 6 Filterpapiere in 6-Aminohexansäure -haltigem Tris-Puffer getränkt. Da der Aufbau luftblasenfrei erfolgen musste, wurden die jeweiligen Filterpapiere mit einer Gummiwalze fest angerollt. Sollten mehrere Gele geblottet werden, wurde nach dem

Aufbau jeweils einer Transfereinheit ein Blatt Cellophan eingelegt und der beschriebene Aufbau wiederholt. Nach dem Transfer wurde die mit Proteinen beladene Membran zur Blockierung freier Bindungsstellen eine Stunde in TBS-Tween pH 7,4 mit 5 % Magermilchpulver (w/v) inkubiert. Wenn nur eine Membranfärbung zur Darstellung des Proteinspektrums durchgeführt werden sollte, wurde keine Blockierung mit Magermilchpulver angeschlossen.

Anodenpuffer I, pH 10,4

0,3 M Tris	36,3 g
20 % MeOH (w/v)	200 mL
ad 750 mL H ₂ O _{dest.} , pH 10,4 mit HCl _{verd.} einstellen, MeOH hinzufügen ad 1000 mL mit H ₂ O _{dest.}	

Anodenpuffer II, pH 10,4

0,025 M Tris	3,03 g
20 % MeOH	200 mL
ad 750 mL H ₂ O _{dest.} , pH 10,4 mit HCl _{verd.} einstellen, MeOH hinzufügen ad 1000 mL mit H ₂ O _{dest.}	

Kathodenpuffer III, pH 9,4

0,025 M Tris	3,03 g
40 mM 6-Aminohexansäure	5,2 g
10 % MeOH	100 mL
ad 750 mL H ₂ O _{dest.} , pH 9,4 mit HCl _{verd.} einstellen, MeOH hinzufügen ad 1000 mL mit H ₂ O _{dest.}	

TBS-Puffer, pH 7,4

100 mM Tris/HCl	12,14 g
100 mM NaCl	5,84 g NaCl
2,5 mM MgCl ₂	0,508 g
ad 750 mL H ₂ O _{dest.} , pH 7,4 überprüfen, ad 1000 mL mit H ₂ O _{dest.}	

TBS-Tween-Puffer, pH 7,4

TBS pH 7,4	Puffer links
0,05 % Tween 20	500 µL
500 µL Tween 20 zu TBS-Puffer, pH 7,4 zugeben	

3.3.5 India-Ink Färbung / AuroDye-Färbung

Sowohl zur Überprüfung des Transfers als auch zur Darstellung der Markerproteine erfolgte die unspezifische Färbung der fixierten Proteine mittels India-Ink (Hancock und Tsang, 1983) oder AuroDye Fertigreagenz. Die NC-Membranen wurden ca. 2 – 3 h in der Färbelösung bis zum Anfärben der Proteinbanden inkubiert.

Färbelösung India Ink

0,1 % India-Ink	40 µL
ad 40 mL TBS-Tween pH 7,4	

AuroDye

gebrauchsfertige Lösung

3.3.6 Immunozytometrische Nachweise

Die folgende Versuchsdurchführung entspricht dem letzten angewandten Entwicklungsstand und wurde während der gesamten Arbeit auf Verbesserungen hin überprüft und entsprechend angepasst.

Die Blotmembranen wurden zu präparativen Ansätzen wie z.B. zur Überprüfung der Antikörperreaktivitäten in Streifen geschnitten und bei analytischen Fragestellungen in ihrer Gesamtheit verwendet.

3.3.6.1 Nachweis der CP4 EPSP-Synthase aus Lebensmittelextrakten

Zur immunenzymatischen Detektion der CP4 EPSP-Synthase innerhalb eines getrennten Proteinspektrums wurden die Blotmembranen mit 1:10.000 verdünntem polyklonalen Antiserum oder mit dem von TNO (Niederlande) zur Verfügung gestellten monoklonalen Antikörper (mab) über Nacht inkubiert. Im Anschluss wurde mit 1:10.000 verdünntem, mit alkalischer Phosphatase markiertem Ziege-anti Kaninchen IgG + IgM Antikörper 2 h inkubiert.

Zwischen den Inkubationsschritten wurden die Membranen 3x für je 10 min mit TBS-Tween pH 7 gewaschen und vor der Detektion mit TBS pH 9,5 bei 37 °C 10 min äquilibriert. Die Detektion der Antikörperbindungen auf den Membranen erfolgte durch die Inkubation mit Chromogen-Substrat-Lösung (NBT/BCIP). Die auf 37 °C angewärmten NBT/BCIP-Lösungen wurden unmittelbar vor dem Nachweis gemischt und anschließend mit den AP-markierten Membranen im Dunkeln mind. 2 min bis zu 15 min inkubiert. Die Reaktion wurde nach ausreichender Anfärbung mit H₂O_{dest.} gestoppt.

Zur Ermittlung von Nachweisgrenzen wurden die zertifizierten Referenzmaterialien mit Konzentrationen von 0,1 %, 0,5 % und 1 % verwendet und zunächst nach dem oben beschriebenen Verfahren eingesetzt.

3.3.6.2 Nachweis der Reaktivitäten des polyklonalen Kaninchenserums

Zur Überprüfung des Kaninchenpräimmunserums und der Reaktivitäten der Antikörper nach den ersten Immunisierungen wurde das rekombinante Protein (10 µg EPSPS/Slot) auf die NC-Membranen geblottet. Die Membranen wurden in Streifen geschnitten und in 8-Kanalschalen über Nacht mit dem Präimmunserum und den Antiseren auf dem Schüttler inkubiert. Nach der Inkubation mit dem sek. Ziege-anti Kaninchen Antikörper wurden die Streifen mit Tesafilm zusammengeklebt und 10 min in TBS pH 9,5 bei 37 °C äquilibriert. Die Detektion erfolgte analog wie oben unter 3.12.1 beschrieben.

Zur Ermittlung optimaler Verdünnungen der polyklonalen Antiseren und der sek. Antikörper wurden Titrationsversuche durchgeführt. Hierbei wurden bei konstanter Antigenkonzentration von 4,3 µg Protein/cm Gel die Verdünnungen der polyklonalen Kaninchenserum und der sek. Antikörper variiert. Zur Kontrolle unspezifischer

Bindungen wurde anstelle des polyklonalen Kaninchenserums mit TBS-Tween, pH 7,4 inkubiert und analog zum beschriebenen Verfahren gearbeitet.

Waschpuffer-TBS-Tween pH 7,4, siehe SemiDryBlotting 3.3.4

TBS-Puffer, pH 9,5

100 mM Tris/HCl	12,14 g
100 mM NaCl	5,844 g
5 mM MgCl ₂	1,016 g

ad 750 mL H₂O_{dest.}, pH 9,5 überprüfen,

ad 1000 mL mit H₂O_{dest.}

NBT-Lösung

10 mg NBT Tablette
lösen in 30 mL TBS pH 9,5,
aliquotieren, bei 4 °C haltbar

BCIP-Lösung

25 mg BCIP Tablette
lösen in 5 mL DMSO, aliquotieren zu je 1mL
Lagerung bei -20 °C

Antiseren

Hybridomzellüberstände	unverdünnt
polyklonale Kaninchenserum, affinitätsgereinigt	1:10.000 in TBS-Tween
Sek. Nachweisantikörper (affinitätsgereinigt)	1:10.000 in TBS-Tween
Ziege anti Maus, IgG+IgM (H+L)-AP	

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 DNA-Isolierung aus dem Untersuchungsgut mittels CTAB-Methode

Die Extraktion der DNA erfolgte gemäß den Vorschriften nach der Methode § 35 LMBG (L 23.01.22-1). Zur Extraktion wurden 200 mg Probe in 2 mL Eppendorfgefäße eingewogen und das Gewebe zuvor mit geeignetem Werkzeug zerkleinert. Die Sojabohnen wurden zuvor über Nacht in H₂O_{dest.} gequollen.

Die Lyse wurde mit 500 µL CTAB-Puffer durchgeführt und anschließend 30 min bei 65 °C auf dem Schüttler inkubiert. Nach einer Zentrifugation 10 min/15.000 g wurde der wässrige Überstand vorsichtig abgenommen und mit 200 µL Ready-Red Fertiglösung versetzt. Der Ansatz wurde 30 s gemischt und für 10 min bei 15.000 g zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen, in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit 2 Volumenteilen CTAB-Präzipitationslösung versetzt und 30 min auf dem Schüttler inkubiert. Zur Präzipitation wurde 30 min zentrifugiert, anschließend 350 µL NaCl zugegeben und wieder 30 min auf dem Schüttler inkubiert. Ein erneuter Reinigungsschritt mit 350 µL Chloroform wurde angeschlossen und 30 s gemischt. Zur Trennung der Phasen wurde wieder zentrifugiert und die wässrige Phase im Anschluss in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Zur Fällung der Nukleinsäuren wurden 0,6 Volumenanteile Isopropanol (4 °C) zugegeben und der Ansatz für 30 min

bei 4 °C gekühlt. Im Anschluss wurde 30 min bei 15.000g/4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet mit 500 µL 70%igem Ethanol gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren (10 min 15.000 g/4 °C) wurde der Überstand verworfen und das zurückgebliebene DNA-Pellet in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Die Nucleinsäuren wurden in 30 µL H₂O_{dest.} gelöst.

CTAB-Extraktions-Puffer

55 mM CTAB	20 g
1,4 M NaCl	81,82 g
0,1 M Tris	100 mL 1 M Tris-HCl
20 mM Na ₂ -EDTA	40 mL 0,5 M Na ₂ -EDTA

pH 8,0 mit HCl_{verd.} einstellen ad 1000 mL
H₂O_{dest.}, CTAB löst sich schlecht über Nacht
stehen lassen, sf. (0,22 µm), autoklavieren

EDTA 100 mM

100 mM Titriplex III
100 mL 0,5 M EDTA

Ad 500 mL mit H₂O_{dest.}, sf.
(0,22 µm), autoklavieren

3.4.2 DNA-Reinigung

Um die extrahierte DNA von möglichen inhibitorischen Substanzen wie z.B. Proteasen und Polyphenolen (Rossen *et al.*, 1992; De Broer *et al.*, 1995), die sich in erster Linie auf die Polymeraseaktivität in der PCR störend auswirken, zu reinigen, wurde je nach Fragestellung (z. B. der Bereitstellung der Fragmente) eine Säulenreinigung mit dem QIAquick PCR Purification (QIAGEN) Kit nach Herstellerangaben angeschlossen.

3.4.3 Konzentrationsbestimmung der DNA**3.4.3.1 Fluorometrische Konzentrationsbestimmung**

Die Bestimmung des DNA-Gehaltes nach der Extraktion erfolgte fluorometrisch mit dem Hoefer DyNA Quant™ Fluorometer unter Verwendung des Fluoreszenz-Farbstoffes Bisbenzimid 33258 (Hoechst). Der Farbstoff bindet selektiv an DNA, wobei er seine sterische Konformation ändert. Durch Anregung des Komplexes mit Licht der Wellenlänge 365 nm wird Licht der Wellenlänge 460 nm emittiert, das vom Fluorometer gemessen wird. Das Gerät wurde mit einer Standardlösung (100 ng/µL) von Kalbsthymus-DNA kalibriert. Die Kalibrierung wurde solange wiederholt, bis der angezeigte Wert reproduzierbar war. Die Ermittlung der Probenkonzentration erfolgte mit 2 µL Probe, die mit 2 mL Messlösung in der Quarzküvette versetzt und vermessen wurden.

TNE Stammlösung (10x)

100 mM Tris	12,11 g
10 mM EDTA	3,722 g
2 M NaCl	116,89 g

ad 800 mL H₂O_{dest.}, mit HCl konz. pH 7,4 einstellen,
ad 1000 mL mit H₂O_{dest.}, sf. (0,45 µm), autoklavieren

TNE Gebrauchslösung (1x)

Vor Gebrauch frisch durch 1:10 Verdünnung herstellen

3.4.3.2 Gelelektrophoretische Konzentrationsbestimmung

Eine Mengenabschätzung der PCR-Amplifikate erfolgte mit Hilfe von DNA-Längenstandards die äquimolare Mengen aus geschnittener genomischer DNA enthielten. Zur Mengenabschätzung wurde ein Längenstandard von ähnlicher Fragmentgrösse wie der der Amplifikate verwendet, von dem je 1 µL und 2 µL auf Agarosegelen aufgetragen wurden. Von der gereinigten Probenlösung wurden 2 µL auf das Gel aufgetragen. Nach der Auftrennung im Gel wurde eine Bande des Längenstandards, die der Intensität der Probenbande gleich, visuell ausgewählt. Aus dem Verhältnis der Basenpaare (Bp_{Bande}) der Referenzbande zur Summe der Basenpaare des Längenstandards (Bp_{Gesamt}) wurde die Konzentration der Proben-DNA (C_{Probe}) nach der unten aufgeführten Gleichung berechnet.

$$C_{\text{Probe}} (\text{ng} / \mu\text{L}) = \frac{Bp_{\text{Bande}}}{Bp_{\text{Gesamt}}} \times C_{\text{Standard}} (\text{ng} / \mu\text{L}) \times \frac{V_{\text{Standard}} (\mu\text{L})}{V_{\text{Probe}} (\mu\text{L})}$$

3.4.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)**3.4.4.1 PCR gemäß § 35 LMBG**

Die PCR zum Nachweis von Sequenzveränderungen gentechnischer Herkunft wurde gemäß der Methode nach § 35 LMBG (L 23.01.22-1) in 25 µL Ansätzen in dünnwandigen 0,2 µL PCR-Gefäßen durchgeführt. Zunächst wurden mit den in der Tabelle 3 a angegebenen Komponenten N Ansätze Mastermix hergestellt, zu dem unmittelbar vor dem Start der PCR die nach 3.4.1 isolierte Proben-DNA pipettiert wurde. Zur Überprüfung der Reinheit der Mastermix-Komponenten und des Wassers sowie zur Überprüfung einer Kontamination beim Ansetzen der PCR wurde eine Wasserprobe mitgeführt, bei der die Proben-DNA durch Wasser ersetzt wurde.

Tab. 3 a: Ansatz für 1 Reaktion zum Nachweis von genetisch veränderten RR[®]-Sojabohnen gemäß der Methode nach § 35 LMBG (L 23.01.22-1).

Reagenzien	1 Reaktionsansatz	Ausgangskonzentration
Puffer	1x [2,5 µL]	10x
MgCl ₂	2 mM [2 µL]	25 mM
dNTPs	je 200 µM [2 µL]	2,5 mM
Primer 1	0,5 µM [1 µL]	20 µM
Primer 2	0,5 µM [1 µL]	20 µM
Taq-Polymerase	1,5 U/µL [0,3 µL]	5 U/µL
H ₂ O	14,4 µL	
DNA	2 µL	variabel
Summe	25 µL	

Tabelle 3 b zeigt die Thermocycler-Bedingungen für den Nachweis des Lectin-Gens, Amplifikatgröße 118 Bp, zur Kontrolle der Amplifizierbarkeit der extrahierten DNA, und die Bedingungen für den spezifischen Nachweis der gentechnischen Veränderung in RoundupTM Ready Sojabohnen, Amplifikatgröße 179 Bp.

Tab. 3 b: Thermocycler Bedingungen für den Soja-spezifischen Nachweis, Lectin-Gen Amplifikatgröße 118 Bp (35 Zyklen), links dargestellt. Die Thermocyclerbedingungen für den spezifischen Nachweis von RR-Sojabohnen mit einer Amplifikatgröße von 179 Bp (45 Zyklen) ist auf der rechten Seite dargestellt.

Schritt	Temperatur	Zeit	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95 °C	10 min	95 °C	10 min
Denaturierung	95 °C	30 sec	95 °C	30 sec
Hybridisierung der Primer	60 °C	30 sec	62 °C	30 sec
Elongation	72 °C	1 min	72 °C	25 min
Finale Elongation	72 °C	3 min	72 °C	6 min
Ende	4 °C	∞	4 °C	∞

3.4.4.2 Real-time PCR (TaqManTM-Technologie) zur Quantifizierung von RR[®]-Soja

Die Quantifizierung der Anteile an RR[®]-Soja bei Sojabohnen und Sojabohnenprodukten erfolgte mittels Real-time quantitativer PCR (TaqManTM-Verfahren) in Anlehnung an das Ringversuchsprotokoll Tender XXIV/98/A3/001 (2000). Die Quantifizierung erfolgte als relative Quantifizierung über das Verhältnis der bekannten Amplifikatmenge von RR[®]-Soja DNA zu der bekannten Menge an Soja-Lektin DNA (repräsentiert den Gesamt-Soja Anteil). Die Amplifikatmengen der relevanten Genabschnitte wurden als Kopienzahlen, ausgehend vom Verhältnis der Ct-Werte zur Ausgangskopienzahl des zertifizierten Referenzmaterials (CRM, Fluka), über das Standardkurvenverfahren ermittelt. Hierzu wurden jeweils 5 Standards ausgehend von

5%igem RR[®]-Sojamehl in den Verdünnungen 1:10, 1:40, 1:100, 1:500 und 1:2.000 zur Generierung der Standardkurve eingesetzt.

Bei dieser Methode werden zunächst 2 getrennte Quantifizierungsläufe für

1. den Nachweis für Soja über das Lektin-Gen
2. den RR[®]-Soja Nachweis [spezifischer Nachweis der Übergangsregion zwischen der 35S Promotorsequenz des Blumenkohlmosaikvirus (CaMV) und der aus *Petunia hybrida* stammenden Transitpeptidsequenz (CTP)]

durchgeführt.

Abbildung 16 zeigt ein Auswertungsbeispiel nach erfolgter TaqMan PCR über das Standardkurvenverfahren. Nach Auftragung der beiden getrennten PCR-Läufe wird zunächst die Kopienzahl sowohl für den Soja-Anteil (Lektin Gen) als auch für den RR[®]-Soja-Anteil bestimmt. Aus den beiden Einzelergebnissen wird der Quotient gebildet, der den Anteil von RR[®]-Soja DNA im prozentualen Verhältnis zur Menge an Gesamt Soja-DNA (Lektin-Gen) bezogen auf die Zutat Soja im Lebensmittel wiedergibt.

Die Festlegung der Ausgangskopienzahl für die erste Verdünnungsstufe des Lektin Standards erfolgt willkürlich (s. gelb markiertes Feld), während die Kopienzahlen der nachfolgenden Standards ihrer Verdünnungsstufe entsprechend in Bezug zur Ausgangskopienzahl berechnet wurden. Da alle Standardverdünnungen aus dem 5%igen RR[®]-Sojamehl hergestellt wurden, beträgt der Anteil für das Lektin Gen 100 % und der des RR[®]-Soja maximal 5 %. Folglich müssen die Kopienzahlen der einzelnen RR[®]-Soja Standards immer 5 % der Kopienzahl des entsprechenden Lektin Standards betragen. Die Auftragung der Standardreihe erfolgte nach Anwendung des dekadischen Logarithmus auf die Kopienzahlen (log Kopienzahlen) um die Darstellung der Grafik und die Berechnung der Geradengleichung zu vereinfachen.

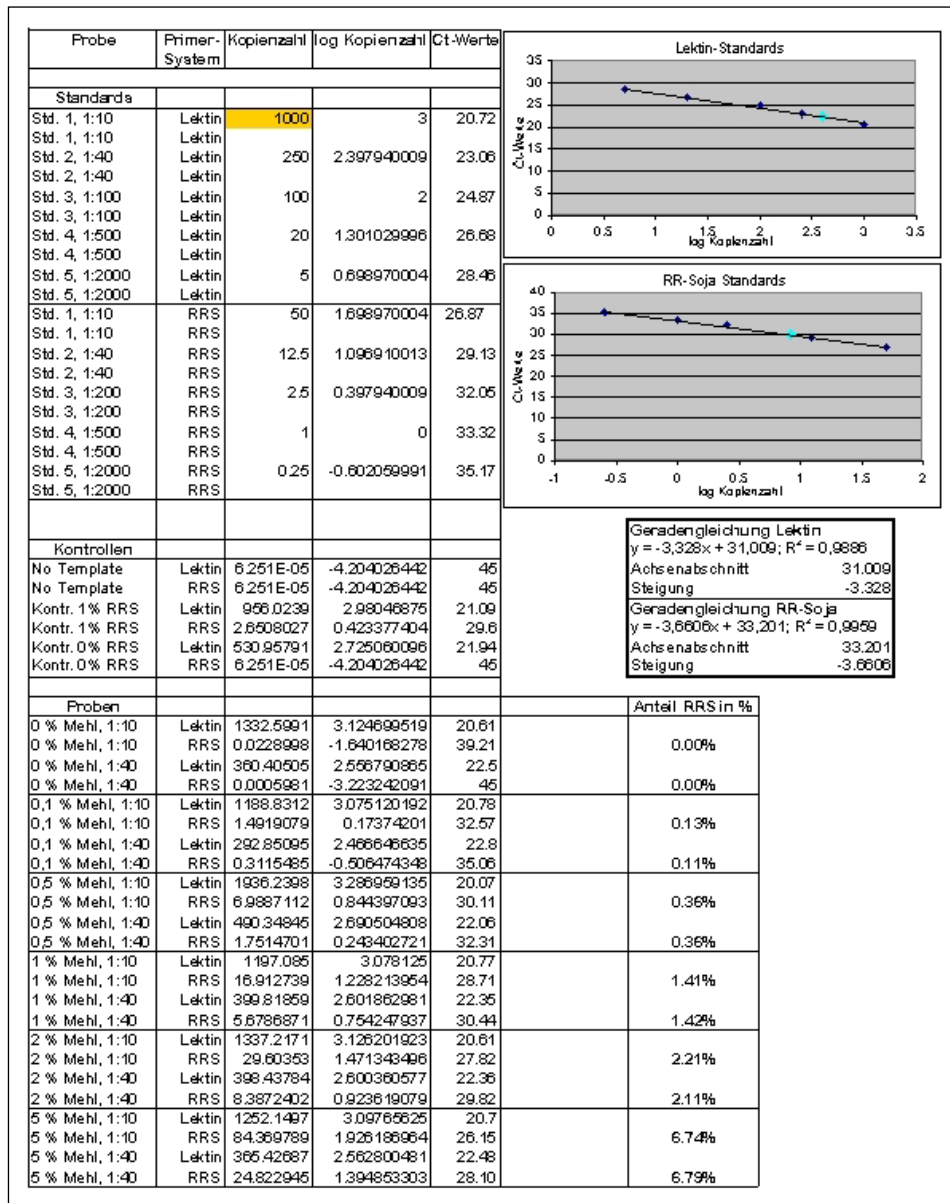


Abb. 16: Auswertungsbeispiel einer relativen Quantifizierung mittels Standardkurvenverfahren in der Real-time PCR. Die dargestellten Ct-Werte sind als Mittelwerte angegeben. Anhand der Ct-Werte kann am Schnittpunkt mit der Standardgeraden die zugehörige Kopienzahl für RR[®]-Soja bzw. Lektin-Soja abgelesen werden (hellblaue Markierung) bzw. über die Geradengleichung berechnet werden.

Alle Real-time PCR wurden mit dem ABI PRISM[™] 7700 Sequence Detection System (7700 SDS) durchgeführt. Dieses Gerät besitzt einen eingebauten Thermocycler mit einer Kapazität von bis zu 96 Proben. Als PCR-Komponenten wurden u.a. ein Universal MasterMix (Applied Biosystems) verwendet, der bis auf die Primer und Sonden alle notwendigen Reagenzien enthielt. Wie bei allen anderen PCR-Ansätzen muss die Menge für die Reaktionsansätze entsprechend der durchzuführenden Reaktionen berechnet werden. Zur Überprüfung der Reinheit der Mastermix-Bestandteile und zum Ausschluss von Kontaminationen wurde bei allen Versuchen eine Wasserprobe

mitgeführt, die anstelle der zu amplifizierenden DNA nur das zur Verdünnung verwendete Wasser enthielt. Tabelle 4 a enthält die typische Zusammensetzung für einen Reaktionsansatz. Tabelle 4 b zeigt die Thermocyclerbedingungen.

Chemikalien

5 % RR[®]-Sojamehl (CRM, Fluka) zur Herstellung der Standardreihen nach DNA-Extraktion in den Verdünnungen von 1:10, 1:40, 1:100, 1:500 und 1:2.000.

Vorgaben für Ct-Werte Soja-Referenz-Standardreihe: 23-29

Vorgaben für Ct-Werte RR[®]-Soja-Standardreihe: 28-34

TaqMan [®] Universal Mastermix:	AmpliTaq Gold DNA Polymerase, Amperase UNG, dNTPs mit UTP, passive Referenz optimierte Pufferkomponenten inklusive MgCl ₂ .
Primer 20 µM:	GM1-F/GM-1/R (Lektin-Gen); RR1-F/RR1-R (RR [®] -Soja) vgl. 3.1.5
Sonde 20 µM:	GM1-Sonde; RR1-Sonde, vgl. 3.1.5
DNA:	1:10 und 1:40, je 5 µL
H ₂ O _{dest.} :	

Tab. 4 a: Ansatz für 1 Reaktion zum Nachweis von genetisch veränderten RR[®]-Sojabohnen in Anlehnung an die Methode von Ringversuch Tender XXIV/98/A3/001.

Reagenzien	1 Reaktionsansatz [µL]	Ausgangskonz.	Endkonz.
TaqMan [®] Univ. MM	12,5	2x	1x
Foreward Primer [µM]	0,375	20	0,3
Reverse Primer [µM]	0,375	20	0,3
Sonde [µM]	0,25	20	0,2
H ₂ O _{dest.}	2,5		
DNA	9		
Summe	25		

Tab. 4 b: Temperaturprogramm für den ABI PRISM 7700 SDS.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Start: Aktivierung und Aufschmelzen der DNA	95 °C	10 min	
Denaturierung	95 °C	15 sec	45x
Annealing	54 °C	15 sec	
Extension	60 °C	45 sec	

3.4.5 DNA-Agarosegelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Amplifikaten erfolgte mittels horizontaler Gelelektrophorese. Hierzu wurden 1 % oder 2%ige Agarosegele in TBE-Puffer mit 1 % Ethidiumbromid in Abhängigkeit des zu trennenden Amplifikates gegossen. Zur Abschätzung der aus der PCR erhalten Fragmentgrößen wurden Längenstandards bekannter Größe mit auf das Gel aufgetragen und mit den Amplifikaten verglichen. Die Farbstandards in den Gel-Lade-Puffern müssen so

gewählt werden, dass sie in der Elektrophorese nicht die gleichen Laufeigenschaften besitzen wie die zu trennenden DNA-Fragmente, da sie diese sonst überdecken würden. Bei Amplifikaten < 500 Bp wurde Xylencyanol verwendet. > 500 Bp wurde Bromphenolblau eingesetzt. Zur Auftragung wurden 8 µL Amplifikat mit 2 µL Xylencyanol/Bromphenolblau versetzt und direkt in die Probentaschen gegeben. Mit dem Längenstandard wurde analog verfahren. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 150 Volt und 100 mA innerhalb von 50 min durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel in einer Video-Dokumentationseinheit mit UV-Licht bestrahlt, die DNA durch das interkalierende Ethidiumbromid sichtbar gemacht und mit der Digitalkamera fotografiert.

Tris-Borat Stammlösung (10x TBE)

0,45 M Tris-borat	54 g Tris-Base
	27,5 g Borsäure
0,01 M EDTA	20 mL 0,5 M EDTA (pH 8,0)
<u>ad 1000 mL H₂O_{dest.}</u>	

TBE Gebrauchslösung (0,5x TBE)

Vor Gebrauch durch 1:10 Verdünnung herstellen

Gel-Lade-Puffer I

0,25 % Bromphenolblau	3,75 g
40 % Saccharose	600 mg
<u>ad 1500 mL H₂O_{dest.}, Lagerung bei 4 °C</u>	

Gel-Lade-Puffer II

0,25 % Xylencyanol	3,75 g
40 % Saccharose	600 mg
<u>ad 1500 mL H₂O_{dest.}, Lagerung bei 4 °C</u>	

3.4.6 DNA-Sequenzierung

Eine Überprüfung der Basenabfolge verwendeter Genabschnitte sowie der Ausschluss des Einbaus von Fehlbasen für die Klonierung wurde mit isolierter DNA und mit PCR-Produkten gemäß der Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977, vgl. 2.3.2.6) durchgeführt. Die zu sequenzierende DNA wurde mit dem Sequenzierungspremix (Applied Biosystems) nach dem Big Dye Terminator Protokoll nach den Angaben der Hersteller amplifiziert (sog. Cycle Sequencing). Vor der Durchführung der Sequenzierungsreaktion wurde die einzusetzende DNA-Menge durch Gelelektrophorese ermittelt (siehe 3.4.3.2). Beim Cycle-Sequencing wurde ein Gemisch aus Desoxynucleotiden (dNTPs) und vier verschiedenen fluoreszenzmarkierten Didesoxynucleotiden (ddNTPs) verwendet. Das 5'-Ende eines jeden Fragments wird vom jeweiligen Sequenzierungsprimer gebildet. Das 3'-Ende besteht aus dem fluoreszenzmarkierten Didesoxynucleotid (vgl. Abbildung 13). Die verwendeten Sequenzierungsprimer sind unter 3.5 gelistet. Die überschüssigen ddNTPs wurden nach dem Cycle-Sequencing durch einen Fällungsschritt mit Ethanol und Säulenelution aus dem Sequenzierungsansatz entfernt.

Nach der Fällung wurden die Produkte in 20 μL $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ bei RT für 15 bis 20 min unter Schütteln gelöst. In die Sequenziergefäße wurden 16 μL $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ vorgelegt und 4 μL der DNA-Lösung zugegeben und gemischt. Die Detektion der DNA-Fragmente erfolgte mit dem vollautomatischen Sequenziergerät der Fa. Applied Biosystems, 310 Genetic Analyzer ABI Prism und beruht auf dem Prinzip der Kapillarelektrophorese (vgl. 2.3.2.7). In den Tabellen 5 a und 5 b sind die Reaktionsansätze für das Cycle-Sequencing und die Thermocycler-Bedingungen angegeben. Als Annealing-temperaturen wurden die vom Hersteller der Primer empfohlenen Temperaturen (Schmelzpunkt thermodynamisch) verwendet.

Tab. 5 a: Zusammensetzung des Sequenzierungs-Ansatzes mit einem Endvolumen von 20 μL gemäß der Vorschrift nach Applied Biosystems.

Reagenz	Konzentration	Volumen (μL)
ABI Pre-Mix		6
DNA-Template	10-100 ng	2-13
Primer	5 pmol/ μL	1-13
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$		ad 20

Tab. 5 b: Temperaturprogramm zur Sequenzierungsreaktion mit 25 Zyklen im Perkin-Elmer Thermocycler.

Schritt	Zeit (min)	Temperatur ($^{\circ}\text{C}$)
Start (kann entfallen)	2	96
Denaturierung	0:10	96
Anlagerung	0:05	Anlagerungstemperatur der jew. Primer
Elongation	1:00	60
Ende	∞	4

Bedingungen Genetic Analyzer ABI Prism 310

Kapillare: 50 μm i.D. mit Detektionsfenster
bis 400 Bp-Fragmente: 30 cm Säule
Kapillarmatrix: Performance Optimized Polymer 6 (POP6)
1x Analyzer-Buffer: 310 Genetic Analyzer Buffer 10x mit EDTA, $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$

3.4.6.1 Auswertung der Sequenzierungsdaten

Die zu sequenzierende DNA wurde mit dem Sequenzierungspremix gemäß dem Big Dye Terminator Protokoll nach Herstellerangaben (Applied Biosystems) amplifiziert, dem pro Ansatz nur ein Primer (sense oder antisense) zugegeben wurde. Die Analyse im Sequenziergerät basierte auf der Detektion der fluorophormarkierten DNA-Fragmente direkt im Gel nach Aktivierung mit einem Laser. Die gemessenen Signale wurden durch eine softwaregestützte Umwandlung als verschiedenfarbige Sequenzen dargestellt (vgl. Abb. 14). Die Umsetzung der parallel aufgenommenen

Intensitätskurven (Rohdaten) der vier ddNTPs in eine gemeinsame Kurve erfolgte automatisch durch das Programm „Sequencing Analysis“. Das entstandene Elektropherogramm ermöglicht die Bestimmung der DNA-Sequenz, wobei die Basenfolge manuell überprüft werden muß. Für weitere Auswertungen wie z.B. dem Vergleich verschiedener Sequenzabschnitte untereinander standen die Programme Sequence Navigator™ und MacVector™ zur Verfügung.

3.4.7 Expressionsklonierung

3.4.7.1 Bereitstellung von DNA-Fragmenten zur Klonierung

Das zur Klonierung bestimmte DNA-Fragment (CP4 EPSPS-Konstrukt, 1369 Bp) wurde nach der Isolierung der Gesamt-DNA aus dem Bohnenmaterial (CTAB-Methode) zunächst einer Säulenaufreinigung mit dem Qia quick PCR Purifikation Kit (QIAGEN) unterzogen. Die Insertion der geeigneten Restriktionsschnittstellen (Sites) vor die Startsequenz (5'-Ende) und hinter das Stopcodon (3'-Ende) des EPSPS-Gens wurde mittels PCR realisiert, um mit dem Vektor kompatible Überhänge im Gen zu erhalten. Die eingesetzten Primer wurden so konstruiert, dass sie passende Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Nde* I und *Nsi* I enthielten, und die Fragmente im richtigen Leseraster in die Vektoren inkloniert werden konnten. Die Insertion der Schnittstellen erfolgte mit dem Expand 20 kb^{PLUS} PCR System der Fa. Roche. Dieses System ist besonders geeignet, um größere Fragmente bis zu 20 kB zu amplifizieren.

Optimierung der PCR-Bedingungen

Einen großen Einfluss auf die Qualität des Amplifikates hat die optimale Annealingtemperatur der Primer. Ebenso wichtig ist es, die MgCl₂-Konzentration und die Anzahl der Zyklen möglichst gering zu halten um ein Mismatching der Primer und unspezifische Amplifikate zu vermeiden. Da es sich um ein Amplifikat > 1 kB handelte, wurde der Einsatz einer höheren MgCl₂-Konzentration vorausgesetzt. Die idealen Bedingungen für die PCR wurden mit dem Eppendorf Mastercycler, der innerhalb der Heizblöcke einen Temperaturgradienten von 10 °C aufbauen kann, in Kombination mit dem Expand 20 kb^{PLUS} PCR System ermittelt. Tabelle 6 b zeigt das gewählte Temperaturprogramm. Aufgrund der 3'-5' Exonucleaseaktivität der enthaltenen *Pwo* DNA Polymerase darf diese nicht mit den Primern und den dNTPs in einem Gefäß angesetzt werden. Daher wurde der Ansatz getrennt und auf Eis in zwei verschiedenen Gefäßen angesetzt (vgl. Tab. 6 a).

Tab. 6 a Optimierung der Zyklenzahl und der MgCl_2 -Konzentration für die Bereitstellung des DNA Fragmentes. Angegeben in der Tabelle sind jeweils die Ansätze eines Mastermixes für eine Reaktion bei unterschiedlicher MgCl_2 -Konzentration.

	Reagenzien	1 Reaktionsansatz (Konz. MgCl ₂ 2,0 mM)	1 Reaktionsansatz (Konz. MgCl ₂ 2,5 mM)
Gefäß 1	H ₂ O _{dest.}	30,56 µL	27,56 µL
	dNTPs	8 µL	10 µL
	Primer 1/ Primer 2	4 µL/4 µL	4 µL/4 µL
	DNA	[2 µL]	[2 µL]
Gefäß 2	H ₂ O _{dest.}	30,56 µL	27,56 µL
	Puffer	10 µL	10 µL
	MgCl ₂	8 µL	10 µL
	Polymerasen-Mix	0,88 µL	0,88 µL

Tab. 6 b: Temperatur-Zeit-Programm für eine PCR mit 30 Zyklen mit dem Expand 20 kb^{PLUS} PCR System der Fa. Roche. Bei 35 Zyklen wurden die unten angegebenen 20 Zyklen um 5 Zyklen erhöht.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
initiale Denaturierung	94 °C	2 min	
Denaturierung	94 °C	10 sec	
Hybridisierung der Primer	65 °C	30 sec	10x
Elongation	72 °C	1 min	
Denaturierung	94 °C	10 sec	
Hybridisierung der Primer	65 °C	30 sec	20x
Elongation	72 °C	1 min + 5 sec/cycle	
Finale Elongation	72 °C	7 min	

3.4.7.2 Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die zur Klonierung eingesetzten DNA-Fragmente wurden aus 1%igen Agarosegelen nach elektrophoretischer Trennung und Visualisieren auf dem UV-Tisch ausgeschnitten und mit Hilfe des QIAquick Gel ExtraktionKit (QIAGEN) nach Herstellerangaben eluiert. Die Mengenabschätzung der DNA erfolgte mit dem Längenstandard Nr. III (s.o.), der äquimolare Mengen geschnittener genomischer DNA enthält.

3.4.7.3 Vektoren

Als Expressionsvektoren wurden von der Fa. Genexpress modifizierte Plasmide (pQE-90S/pQE-100S) eingesetzt. Die beiden verwendeten Plasmide unterscheiden sich in der Position des „Histidin-Tags“, der bei pQE-90S C-terminal und bei pQE-100S N-terminal vorliegt.

3.4.7.4 Restriktion von DNA und Plasmiden

Die Restriktion des DNA-Fragmentes und der Plasmide erfolgte unter Verwendung der Restriktionsendonucleasen *Nde* I und *Nsi* I nach dem unten angegebenen Schema. Nach

der Restriktion wurden die erhaltenen Produkte zur Kontrolle im Agarosegel getrennt. Die Banden der entsprechenden Größe wurden erneut auf dem UV-Tisch ausgeschnitten und die verbleibende Agarose mit dem JetSorb Kit (Machery und Nagel) entfernt.

Tab. 7: Präparation des Plasmids und des DNA-Fragmentes

DNA		Vektor pQE-90S/pQE-100S	
<i>Nsi</i> I (10 U/μl)	1 μL	<i>Nsi</i> I (10 U/μL)	1 μL
<i>Nde</i> I (10 U/μl)	1 μL	<i>Nde</i> I (10 U/μL)	1 μL
DNA	43 μL	H ₂ O	20 μL
Puffer H (Peqlab)	5 μL	Puffer H (Peqlab)	3 μL
		90s/100s	5 μL
Endvolumen	50 μL	Endvolumen	30 μL

Inkubation über Nacht bei 37 °C. Inkubation 1 - 2h bei 37 °C

3.4.7.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation der Ziel-DNA mit den Plasmiden erfolgte über die inserierten *Nde* I und *Nsi* I Schnittstellen nach dem unten angegebenen Protokoll. Der Ansatz wurde im Verhältnis von 1:7 von Vektor zu DNA (3 bis max. 10facher molarer Überschuss an DNA) und 1 Einheit T4-DNA-Ligase in dem vom Hersteller mitgelieferten Ligasepuffer in einem Volumen von 10 μl durchgeführt. Der Ligationsansatz wurde bei 16 °C über Nacht inkubiert, und im Anschluss wurde der gesamte Ansatz (ca. 10 μL) für die Transformation von *E. coli* eingesetzt.

Tab. 8: Ligation der Ziel-DNA in das Plasmid.

DNA + Plasmid		Kontrolle	
2 μL 100s	1 μL 90s	2 μL 100s	2 μL 90s
6 μL DNA	6 μL DNA	6 μL H ₂ O _{dest.}	6 μL H ₂ O _{dest.}
1 μL 10x Puffer	1 μL 10x Puffer	1 μL 10x Puffer	1 μL 10x Puffer
1 μL Ligase	1 μL Ligase	1 μL Ligase	1 μL Ligase
	1 μL H ₂ O _{dest.}		
10 μL	10 μL	10 μL	10 μL

Inkubation bei 16 °C, über Nacht

Inkubation bei 16 °C, über Nacht

3.4.7.6 Kultivierung von *E. coli* –Stämmen und Anlegen von Langzeitkulturen

Die Kultivierung von *E. coli* DH 5 α Stämmen erfolgte bei 37 °C in ampicillinhaltigem LB-Medium (Ampicillin 100 mg/μL). Bei dem Stamm *E. coli* DH 5 α handelt es sich um sogenannte kompetente Zellen. Diese sind in der Lage, DNA-Moleküle wie z.B. Plasmid-DNA aufzunehmen, nachdem sie mit CaCl₂ behandelt wurden. Die Selektion transformierter Kolonien erfolgte über eine Wachstumskontrolle auf LB-Agar-Platten.

Langzeitkulturen der transformierten Kolonien wurden mit 400 µL einer stationären Übernachtskultur und 600 µL 20 % Glycerin hergestellt und bei – 80 °C gelagert.

LB-Medium

10 Trypton
5 g Hefeextrakt
5 g NaCl
ad 1000 mL H₂O_{dest.}, mit NaOH auf pH 7,5
einstellen und autoklavieren.

LB-Agar

LB-Medium + 1,5 % (w/w) Agar,
autoklavieren. Antibiotika zugeben, wenn
die Lösung auf < 50 °C abgekühlt ist.

3.4.7.7 Transformation von *E. coli* mittels Elektroporation

Unter Transformation versteht man die Aufnahme von Plasmid-DNA durch Bakterienzellen wie z.B. durch Elektroporation (Dower *et al.*, 1988). Bei der Elektroporation wird durch einen kurzen elektrischen Impuls die Zellmembran kurzfristig permeabilisiert. Die DNA erhält die Gelegenheit, aus der Lösung die Zellmembran, vermutlich durch Diffusion zu passieren (Mülhardt, 1999). Als kompetente Zellen wurde der Stamm *E. coli* DH5α verwendet. Vor der Transformation wurde der Ligationsansatz auf Filterpapierscheiben (Millipore) dialysiert, um Kurzschlüsse bei der Elektroporation zu vermeiden. Zur Transformation wurden 40 µL der *E. coli* Zellsuspension in die Küvetten gegeben, mit dem gesamten Ligationsansatz (ca. 10 µL) nach der Dialyse versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation erfolgte bei 2800 V (Elektroporator: EC 100; EC Aparatus Coporation). Nach sofortigem Versetzen der Zellen mit 1 mL SOC-Medium und 30 minütiger Inkubation bei 37 °C wurden 200 µL der Zellsuspension auf LB-Platten (Ampicillin 100 mg/µL) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

SOC-Medium

20 g Trypton
5 g Hefeextrakt
0,5 g NaCl
10 mL 0,25 M KCl
5 mL 2 M MgCl₂ ad 1000 mL H₂O_{dest.}, mit NaOH auf pH 7,0
20 mL 1 M Glucose einstellen und autoklavieren.

3.4.7.8 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* (Mini-Präparation)

Die Isolierung der Plasmid DNA aus *E. coli* zur Überprüfung der Transformation erfolgte mit dem Nucleospin Kit (Machery und Nagel). Aus 8 mL einer Übernachtskultur konnten ausreichende Mengen DNA gewonnen werden, die direkt zur erneuten Restriktion mit *Nde* I und *Nsi* I eingesetzt wurden. Im Agarosegel wurden sowohl das

eingeschleuste Plasmid als auch das Insert nachgewiesen. Die isolierte DNA wurde im Anschluss zur Überprüfung der Basenabfolge mittels Sequenzierung überprüft.

3.4.7.9 Übernachtkulturen

Zur Herstellung von Übernachtkulturen wurden 8 Kolonien von den AP-Platten ausgewählt und in jeweils 3,5 mL LB Medium (AP) überimpft. Eine anschließende Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C im Brutschrank.

3.4.7.10 Proteinexpression durch Induktion

Die Expression des Zielproteins CP4 EPSPS erfolgte mittels Induktion von *E. coli* durch IPTG (vgl. 2.3.2.6). Die benötigten Flüssigkulturen wurden mit 50 mL LB-Medium 1:50 aus einer Übernachtkultur beimpft und erneut über Nacht bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Von diesem Ansatz wurden je 8 mL in 3x 400 mL Kulturflaschen (1:50) überimpft und unter Schütteln 2-3 h bei 37 °C bis zu einer $OD_{600} = 0,5$ inkubiert. Nach dem Erreichen der richtigen Bakteriendichte wurde mit IPTG (2 mmol) induziert und im Anschluss erneut 3 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert.

Zur Abtrennung der Bakterien aus dem Medium wurde der komplette Ansatz in 1200 mL Nalgene-Flaschen überführt und 15 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Die Pellets in den Flaschen wurden auf Eis gestellt, jeweils mit 10 mL Puffer A (s. 3.4.7.11) versetzt und das Pellet gelöst. Zur Lyse der Bakterien wurde der gesamte Inhalt der Flaschen in große Zentrifugenröhrchen (Nalgene) überführt und über Nacht im Kühlschrank sanft geschüttelt. Am nächsten Tag wurde erneut 45 min bei 12.000 rpm zentrifugiert.

3.4.7.11 Gewinnung von Zellextrakten zur SDS-PAGE

Vor und nach der Induktion mit IPTG wurde jeweils zum Vergleich 1 mL Bakterienkultur entnommen und bei 5000 rpm 1 min zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 100 µL Probenpuffer (red.) resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

3.4.7.12 Protein-Reinigung unter denaturierenden Bedingungen

Die Reinigung des rekombinanten Proteins aus der Zellsuspension erfolgte unter denaturierenden Bedingungen bei schrittweise fallendem pH-Wert (von pH 8/6,3/5,9 auf 4,5). 5 mL Ni-NTA-Agarose Fertigsuspension wurden in QIAGEN Leersäulen gegeben und mit Puffer A bei 4 °C äquilibriert. Nach der Zentrifugation der

Bakterien/Protein-Suspension (siehe 3.13.5.10) wurde die Säule mit dem Überstand konditioniert und mit Puffer A gewaschen. Hierbei wurden die Fusionsproteine aufgrund ihrer hohen Affinität zu dem Nickel-Chelat-Komplex an die Säulenmatrix gebunden, während alle anderen in der Suspension enthaltenen Bestandteile von der Säule gespült wurden.

Die Säule wurde über eine Schlauchpumpe an einen UV-Detektor angeschlossen und die Säulenbeladung und die Elution über das angeschlossene Schreibersystem kontrolliert. Die Puffer B und C wurden zum Waschen aufgegeben, wenn keine Peaks mehr detektiert wurden bzw. diese abflachten. Die Elution der Proteine erfolgte mit den Puffern D und E in jeweils neue Vorlagen.

Puffer A, pH 8

100 mM NaH ₂ PO ₄	13,8 g NaH ₂ PO ₄
10 mM Tris	1,2 g Tris-Base
6 M GuHCl	573 g Guanidinhydrochlorid
pH 8 mit HCl, ad 1000 mL H ₂ O _{dest}	

Puffer B-E

8 M Harnstoff	480,5 g Harnstoff
100 mM NaH ₂ PO ₄	13,8 g NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O _{dest.}
10 mM Tris Cl	1,2 g Tris-Base
mit HCl pH 8 (B) / pH 6,3 (C) / pH 5,9 (D) / pH 4,5 (E) einstellen	

3.4.8 Dialyse und Konzentrierung von Proteinlösungen

Um die hohen Salzkonzentrationen nach der Säulenreinigung zu entfernen wurde eine Dialyse gegen 1x PBS mit jeweils 1 L in Dialyseschläuchen (SnakeSkin 10.000, Pierce) über Nacht bei 4 °C durchgeführt. Der Puffer wurde insgesamt 3x gewechselt und im Anschluss die Lösung über 1x Filter (Schleicher & Schüll) steril filtriert. Die Konzentrierung der wässrigen Lösung wurde mit Centricon[®] Plus 20 Röhrchen (MW Cut off 10.000) eingesetzt und nach Angaben des Herstellers verfahren. Im Anschluss wurde der Proteingehalt nach Bradford (siehe 3.3.2) bestimmt. Da bei einer denaturierenden Reinigung der rekombinanten EPSPS auch vorhandene Proteasen denaturiert werden, wurde die wässrige Proteinlösung ohne weitere Zusätze aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

3.4.9 Herstellung polyklonaler Antiseren

Zur Herstellung spezifischer Antikörper wurden 2 Kaninchen der Rasse New Zealand White (NZW) innerhalb von 60 Tagen 3x mit dem rekombinanten Protein CP4 EPSPS immunisiert und der Verlauf der Antikörperbildung mittels SDS-PAGE/Immunoblotting überwacht. Die Immunisierung wurde durch die consulting & distribution (bcd, Berlin) durchgeführt. Zur Immunisierung wurden pro Injektion pro Tier 150 µg der rek. CP4 EPSPS eingesetzt. Das verwendete Immunisierungsschema ist in Tabelle 9 dargestellt.

Da in den ersten 14 Tagen nach einer Antigenexposition zunächst nur IgM Antikörper gebildet werden, wurde ein 60 Tage dauerndes Immunisierungsprotokoll mit zweimaligem Boostern nach 21 und nach 49 Tagen verwendet. Erst nach ungefähr 30 Tagen kann mit dem Dominieren von IgG gerechnet werden (Roitt, 1991). Zur ersten Immunisierung wurde Komplettes Freund'sches Adjuvanz zur Stimulation der Immunantwort, bestehend aus hitzeinaktivierten Mykobakterien, nicht metabolisierbarem Mineralöl (Depoteffekt) und einem Emulgator, verwendet. Die Boosterungen (vor 2. und 3. Blutentnahme) wurden mit Inkomplettem Freund'schen Adjuvanz (keine Verwendung von Mykobakterien) durchgeführt.

Tab. 9: Immunisierungsprotokoll zur Herstellung polyklonaler Kaninchenserum. Die Immunisierung wurde mit je 150 µg Antigen/Immunisierung und Kaninchen und Inkomplettem Freund'schen Adjuvanz durchgeführt.

Versuchstag	Maßnahme
0	Gewinnung Präimmunserum
	1. Immunisierung
21	2. Immunisierung
28	Blutentnahme
49	3. Immunisierung
56	Blutentnahme
60	Entbluten der Tiere

3.4.10 Gesamtreinigung polyklonaler Antikörper aus Kaninchenserum

3.4.10.1 Ammoniumsulfatfällung

Zur Anreicherung der Immunglobuline und Abtrennung des Albumins vor der Affinitätschromatographie wurden die Seren mit 50%igem Ammoniumsulfat gefällt. Die jeweils benötigten Konzentrationen bei 0 °C wurden aus der Ammoniumsulfat-Sättigungstabelle in Holtzhauer (1995) abgelesen und entsprechend eingewogen. Dazu wurde das Ammoniumsulfat zu feinem Pulver zermörsert und bei 0 °C – 4 °C in kleinen Schritten und, um Konzentrationsspitzen zu vermeiden, erst wenn sich die vorherige Portion gelöst hatte, unter Rühren zum Serum gegeben. Nach der vollständigen Zugabe wurde noch 2 h gerührt und anschließend 30 min bei 4 °C/13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 4 ml PBS resuspendiert und gegen PBS über Nacht bei 4 °C dialysiert (2x 2L).

Ammoniumsulfatlösung: 1,475 g Ammoniumsulfat (NH₄)₂SO₄/5 mL Antiserum

3.4.10.2 Affinitätschromatographie

Zur Erstellung der Immunoaffinitätssäule wurde das rekombinante Antigen CP4 EPSPS kovalent an eine NHS-aktivierte HiTrap-Säule gekoppelt. Gemäß den Angaben des Herstellers wurde das Verhältnis zwischen Ligand und der Sepharose von 1:2 eingehalten. Dazu wurden 10 mL Antigen zu 80 µmol Säulenvolumen pipetiert und 4 h bei RT geschüttelt. Zur Blockierung freier Bindungsstellen wurde anschließend 10 mM Ethanolamin zugegeben und über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Lösung abzentrifugiert, in Äquilibrationpuffer A aufgeschlämmt und damit die Säule gepackt. Die Reinigung und Elution des Antiserums wurde mit der gepackten Affinitätssäule im automatisierten Äkta Explorer System der Firma Amersham Pharmacia Biotech durchgeführt. Die hergestellte Säule (Gelbetthöhe 2 cm) wurde mit Puffer A äquilibriert und mit dem Antiserum (5 mL) beladen (Flow 0,2 mL/min). Die Elution erfolgte mit Puffer B bei einem pH-Wert von 2 (Flow 0,1 mL/min) über einen Stufengradienten mit jeweils 9 Fraktionen à 1 mL. Die Elutionsfraktionen von 1 mL wurden sofort mit je 50 µL NaHCO₃ in der Vorlage neutralisiert. Der gesamte Ablauf der Chromatographie wurde über einen UV-Detektor ($\lambda = 280$ nm) und einen Leitfähigkeitsdetektor überwacht. Die gereinigten polyklonalen Antiseren wurden im Anschluss auf ihre Reaktivität und Spezifität überprüft.

Waschpuffer

1 mM HCl

Kopplungspuffer

1x PBS

Blockierungspuffer

10 mM Ethanolamin

Äquilibrationpuffer A, pH 8,0

0,05 M Tris 3,036 g

0,5 M NaCl 14,61 g

ad 500 mL H₂O_{dest.}**Elutionspuffer-Puffer B, pH ca. 2**

0,05 M Glycin 0,938 g

0,5 M NaCl 14,61 g

ad 500 mL H₂O_{dest.}**NaHCO₃**1 M NaHCO₃ 42 g

Trennsäule: HR 5/5, NHS-aktivierte Sepharose

Füllvolumen 5 mL

4. ERGEBNISSE

4.1 Elektrophoretische Trennung von Sojabohnenextrakten

Einen orientierenden Überblick über die mit wässrigen Lösungsmitteln extrahierbaren Sojaproteine und die zugehörigen Proteinkomponenten gibt Abbildung 17. Die löslichen Sojaproteine in ihren verschiedenen Proteinfractionen wurden gemäß ihrer Ladung und ihres Molekulargewichtes in der reduzierenden SDS-PAGE (vgl. 2.3.1.3) getrennt und mittels Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Deutlich zu erkennen ist, dass sich die getrennten Proteine

über ein von MG-Spektrum 14 bis 90 kDa mit 20 verschiedenen Hauptkomponenten erstrecken. Diese bestehen aus den globulären Speicherproteinen Glycinin (11S) und β -Conglycinin (7S) bzw. aus deren unter den reduzierenden Bedingungen der Elektrophorese dissoziierten Untereinheiten (vgl.

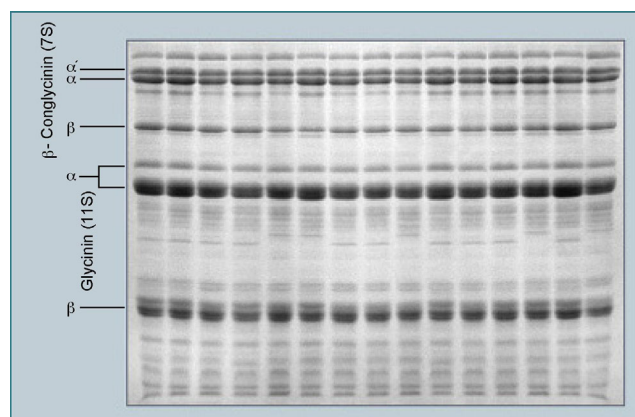


Abb. 17: Untereinheiten der Hauptproteinkomponenten bei Sojabohnen gemäß Yaklich, 2001.

Tab. 10). Speicherproteine in Form von Globulinen sind bei fast allen Leguminosen zu finden (Belitz und Grosch, 1992) und werden nach ihren Sedimentationskoeffizienten in 7S- und 11S-Globuline unterteilt und als Legumin (11S) bzw. Vicilin (7S) bezeichnet. Einzelne Legumine werden oft gemäß ihrer Herkunftspflanze benannt, z.B. Glycinin (Soja), Arachin (Erdnuss).

Tab. 10: Fraktionen bei der Trennung von Sojaproteinen mittels SDS-PAGE.

Bezeichng. der Fraktion	Untereinheit	MW [kDa]	Anteil am Gesamtproteingehalt [%]
β -Conglycinin (7S)	α' , α und β	79/70/50	15
Glycinin (11S)	α -sauer (11S-2)	38	31-42
	β -basisch (11S-1)	26	
CP4 EPSP-Synthase*	-	47,7	0,1

* bezogen auf gentechnisch veränderte Sojabohnen (<http://www.agbios.com>)

Die in den gentechnisch veränderten Sojabohnen zusätzlich exprimierte CP4 EPSP-Synthase (vgl. 2.2.4) hat ein Molekulargewicht von 47,7 kDa. Verglichen mit den

Anteilen des Glycinins (31 – 42 %; Hu und Esen 1981, Huang, *et al.*, 1998) und β -Conglycinins (15 %; Hu und Esen 1981, Huang, *et al.*, 1998) am Gesamtproteingehalt macht der Anteil der CP4 EPSPS 0,1 % aus (Yates, 1999).

4.2 Entwicklung einer Proteinextraktionsmethode

Ziel war es, eine universell einsetzbare Extraktionsmethode mit einem Maximum an extrahierbaren Proteinen auf das breite Spektrum der unterschiedlichsten Lebensmittelmatrices und Prozessierungen zu übertragen, um geeignete Proteinextrakte für die nachfolgende Analytik zu gewährleisten. Die Entwicklung der Extraktionsmethode verlief parallel zum Aufbau des Proteinassays und wurde durch die Bestimmung des Gesamtproteinanteils n. Bradford sowie im Immunoblot zunächst mit dem von der Fa. TNO (Niederlande) zur Verfügung gestellten monoklonalen Antikörper bewertet, bis das polyklonale Antiserum nach Prüfung seiner Funktionalität und Reinigung zur Verfügung stand.

4.2.1 Extraktion von Sojaprotein

Die Entwicklung der Extraktionsmethode erfolgte zunächst aus Bohnenrohmaterial mit und ohne gentechnischer Veränderung (LOT Nr. 30/1; 20/1, vgl. Tab. 1) mit insgesamt 5 unterschiedlichen Extraktionslösungen und je 100 mg Probe wie unter 3.3.1 beschrieben. Die Extraktionsparameter unterschieden sich bezüglich der Extraktionsdauer, Temperaturen und Detergenz-Zusätzen (DTT/SDS/Tween 20) zu den Puffern sowie der pH-Werte der Extraktionslösungen. Die gewonnenen Extrakte wurden anfangs gefriergetrocknet, was allerdings zur Verringerung des messbaren Proteingehaltes und der Reaktivität (Abb. 21) führte, so dass dieser Schritt in der Folge entfiel.

Zur Ermittlung von Nachweisgrenzen wurden die verschiedenen Pufferlösungen an zertifiziertem Referenzmaterial (CRM) der Fa. Fluka mit bekannten Anteilen an RR[®]-Soja (0 %, 0,1 % und 0,5 %) erprobt. Bis zur Überprüfung der optimalen Extraktionsverhältnisse zwischen Puffern und Probe, die ebenfalls mit dem Referenzmaterial durchgeführt wurde, galt ein Verhältnis von 1:10 als Maßstab.

4.2.1.1 Variation der Extraktionstemperatur und Dauer

Um die Auswirkungen unterschiedlicher Temperaturen und Dauer auf die Extraktionen zu beurteilen, wurden Extraktionstemperaturen von 4 °C bzw. 40 °C und eine

Extraktionsdauer von 4 h mit einer Temperatur von 37 °C und einer Dauer von 1 h bzw. 30 min verglichen. Als Extraktionsmittel dienten $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$, 0,01 M PBS und 0,025 M Tris-Tricine und es wurden RR[®]-Sojabohnen und Kontrollbohlen zur Extraktion eingesetzt. Bei den gewonnenen Proteinextrakten wurden zunächst Aussehen und Bandenbeschaffenheit beurteilt und mit Ergebnissen aus der Literatur, wie sie Abbildung 17 zeigt, verglichen.

Abbildung 18 zeigt exemplarisch die Bandenmuster, die aus der Extraktion mit den drei verschiedenen Extraktionslösungen bei den verschiedenen Temperaturen resultierten. Im Vergleich mit Abbildung 17 wird deutlich, dass mit allen Extraktionsmethoden die Hauptspeicherproteine Glycinin und Conglycinin extrahiert werden konnten. Bei der Verwendung einer höheren Temperatur kommt es beim $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ und Tris-Puffer zu einer verstärkten Proteinextraktion.

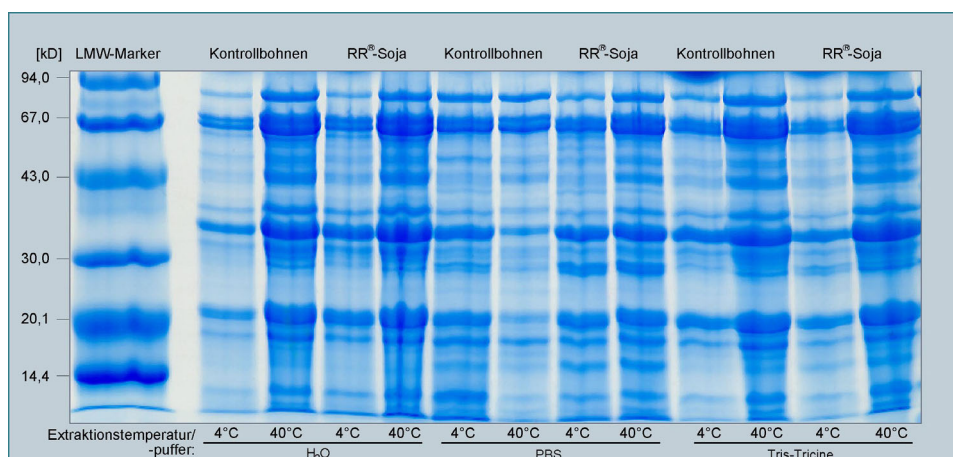


Abb. 18: Übersicht und Vergleich unterschiedlicher Extraktionszeiten, -puffer und -temperaturen.

Die Verwendung des Tris-Puffers führte ferner zu einer Verbreiterung der Banden im Gel. In Abbildung 18 wurden erstmals auch die Extrakte von Kontrollbohlen und RR[®]-Soja gegenübergestellt. Der direkte Vergleich der Bandenmuster und der Anzahl der unterschiedlichen Banden ergab keine Unterschiede. Die Sensitivität der Gelfärbung war allerdings nicht ausreichend, um auch das bei den RR[®]-Sojabohnen zusätzlich exprimierte Protein CP4 EPSPS darzustellen. Ob durch die eingesetzte Extraktionsmethode auch die CP4 EPSPS extrahiert wurde musste durch eine sensitivere Methode, wie z.B. dem Westernblot, überprüft werden.

Aufgrund der langen Extraktionsdauer von 4 h wurde diese in den folgenden Versuchen auf 1 h bzw. auf 30 min reduziert und die Temperatur auf 37 °C verringert. Die anderen Vorgehensweisen wurden beibehalten. Zur Überprüfung der Extrakte stand neben der

Coomassie-Färbung der Gele und der Gesamtproteingehalte ab sofort auch der Nachweis der CP4 EPSPS im Westernblot mittels monoklonalem Antikörper, dargestellt in Abbildung 19 – 21, zur Verfügung. Wie Abbildung 19 a zeigt, waren keine Abweichungen zu den bisherigen Bandenmustern (vgl. Abb. 17/18) sowohl bei den RR[®]-Sojabohnen als auch bei den Kontrollbohnen zu erkennen, und es war von einer vollständigen Extraktion auszugehen.

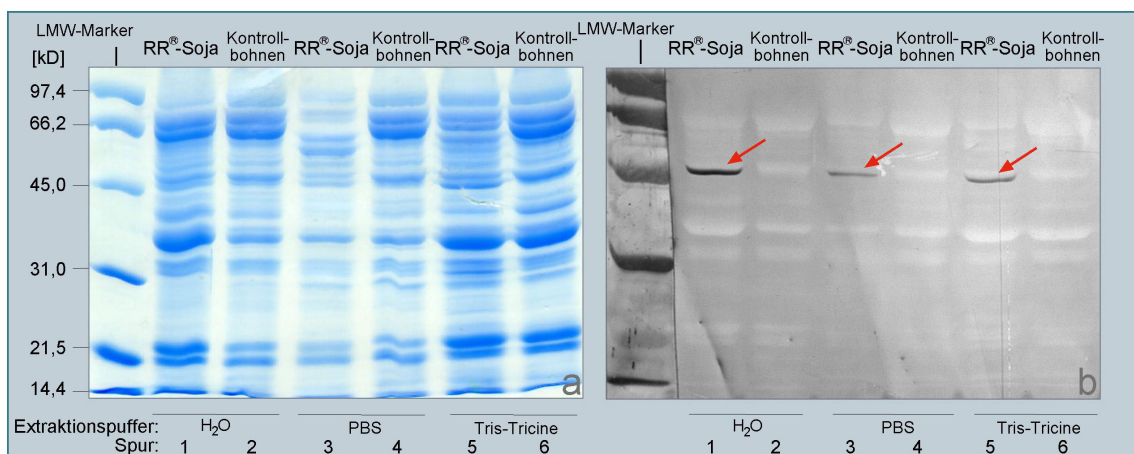


Abb. 19 a + b: SDS-PAGE Coomassie gefärbt (a) und Westernblot (b) der mit unterschiedlichen Puffersystemen innerhalb 1 h bei 37 °C extrahierten Sojaproteine mit und ohne gentechnischer Veränderung. Die aufgetragenen Extrakte wurden 1:10 verdünnt und davon je 10 µL auf das Gel aufgetragen, entsprechend einem durchschn. Proteingehalt von 9,5 µg/0,5 cm Gel. Die Visualisierung im Westernblot erfolgte durch eine enzymatische Umsetzung am monoklonalen Antikörper.

Die deutlichste Färbung (Abb. 19 a) ist bei der Extraktion mit H₂O_{dest.} zu erkennen, während die Färbung der mit PBS-Puffer extrahierbaren Proteine in Spur 3 und 4 bei 67 kDa keine Doppelbande zeigt, und auch die Detektion im Westernblot schwächer erfolgte. Über die durchschnittlichen Proteingehalte der in den Abbildungen 19 und 20 dargestellten Extrakte mit der Zuordnung zu den einzelnen Gelspuren für die unterschiedlichen Extraktionsmittel gibt Tabelle 11 Auskunft. Bei der Betrachtung des Gesamtproteingehaltes der PBS-Extrakte wird deutlich, dass durch den PBS-Puffer im Vergleich zu den anderen Extraktionsmitteln weniger Protein extrahiert wurde.

Ergebnisse

Tab. 11: Gesamtproteingehalte für die hergestellten Extrakte aus Bohnenrohmaterial mit (+) und ohne (-) gentechnischer Veränderung.

Spur	Probe/Puffer	Proteingehalt [mg/mL] Abb. 19 a + b	Proteingehalt [mg/mL] Abb. 20 a + b
1	(+)/H ₂ O	9,5	9,9
2	(-)/H ₂ O	8,4	8,7
3	(+)/PBS	6,5	9,9
4	(-)/PBS	8,1	10,8
5	(+)/TT	10,1	10,1
6	(-)/TT	14,5	8,7

(+) RR[®]-Sojabohnen (Lot-Nr. 30/1); (-) Kontrollbohnen (Lot-Nr. 20/1)

Die Auswertung des Westernblots in Abbildung 19 b, gekennzeichnet durch die roten Pfeile (Spur 1, 3 und 5), bestätigte ferner den direkten Nachweis der CP4 EPSPS durch die Detektion des Proteins bei 47 kDa. Hierbei handelte es sich um die nur bei RR[®]-Sojabohnen zusätzlich exprimierte CP4 EPSP-Synthase. Bei den Kontrollbohnen (Spur 2, 4 und 6), die dieses Protein nicht exprimieren, wurde keine Bande des entsprechenden Molekulargewichtes nachgewiesen.

Abbildung 20 zeigt die SDS-PAGE und den Western blot der gleichen Extraktionspuffer wie in Abbildung 19. Allerdings wurde die Extraktionsdauer auf 30 min (37 °C) reduziert. Bei dieser Untersuchung kam erstmals das polyklonale Antiserum zum Einsatz. Die stärkere Färbung der Banden im Gel und das stärkere Signal im Western blot resultiert aus der größeren Probenauftragsmenge von 15 µL/Slot entsprechend einem durchschnittlichen Proteingehalt von 15 µg/0,5 cm Gel.

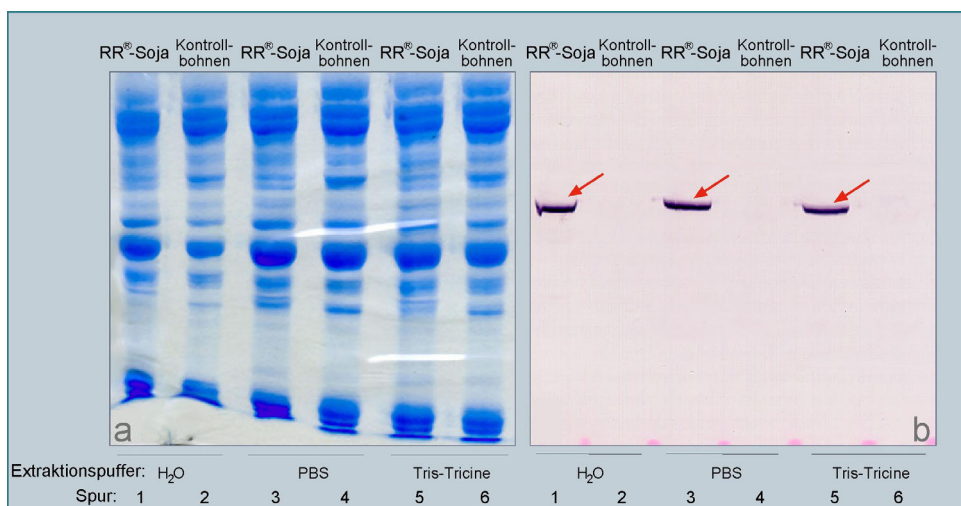


Abb. 20 a + b: SDS-PAGE Coomassie gefärbt (a) und Western blot (b) von mit unterschiedlichen Puffersystemen innerhalb von 30 min bei 37 °C extrahierten Sojaproteinen mit und ohne gentechnischer Veränderung. Die aufgetragenen Extrakte wurden 1:10 verdünnt und davon je 15 µL/Slot entsprechend einem Proteingehalt von 15 µg/0,5 cm Gel auf das Gel aufgetragen. Die Visualisierung im Western blot erfolgte erstmals durch die Reaktion mit dem polyklonalen Antiserum.

Damit lag der Gesamtproteingehalt im Vergleich zu den Ergebnissen aus Abbildung 19 um $5,0 \mu\text{g/mL}$ höher. Bei der Betrachtung der Abbildungen und der Gesamtproteingehalte wird deutlich, dass die Verringerung der Extraktionsdauer nicht zu Einbußen der Extraktionsqualität geführt hatte. Das Soja-typische Bandenmuster zeigt Abbildung 20 a. Eine erfolgreiche Detektion der CP4 EPSPS, markiert durch die roten Pfeile (Spur 1, 3 und 5), zeigt Abbildung 20 b. In den Spuren 2, 4 und 6 wurden jeweils Extrakte aus den Kontrollbohnen aufgetragen.

Nach den bisherigen Ergebnissen hatte die Verwendung unterschiedlicher Extraktionslösungen keine entscheidenden Auswirkungen auf die Qualität der Extrakte. Auch die Verringerung von Temperatur und Zeit war ohne Auswirkungen auf die Qualität und Ausprägung der Banden in der SDS-PAGE und bei der Detektion der CP4 EPSPS im Westernblot. Damit erwies sich eine Extraktionsdauer von 30 min mit den eingesetzten Extraktionsmitteln als ausreichend zur Extraktion der im Westernblot detektierbaren Proteine. Aufgrund der einfachen Handhabung und der universellen Einsetzbarkeit von H_2O und dem $0,01 \text{ M}$ PBS-Puffer wurden diese beiden Puffer für die folgenden Untersuchungen ausgewählt und der Tris-Tricine Puffer nicht weiter zur Extraktion verwendet.

Zum abschließenden Vergleich der Extraktionszeiten und -temperaturen wurden in einem Westernblot (vgl. Abb. 21) Proteinextrakte von $4^\circ\text{C}/40^\circ\text{C}$ Extraktionstemperatur und 4 h Extraktionsdauer mit Extrakten von 37°C Extraktionstemperatur und 60 min bzw. 30 min Extraktionsdauer im direkten Vergleich gegenübergestellt. Die mit den Extrakten korrespondierenden Proteingehalte sind in

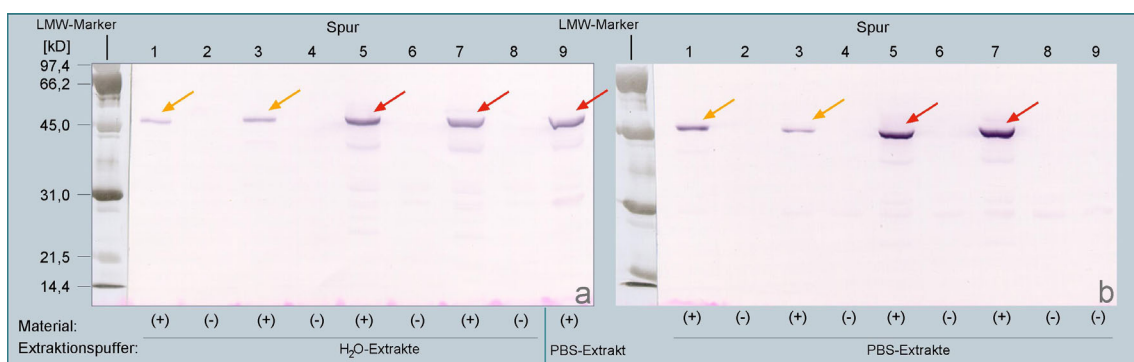


Abb. 21 a + b: Gegenüberstellung der Extraktionskapazität der ausgewählten Puffersysteme a) H_2O und b) PBS im Westernblot von Bohnenrohmaterial bei 4h $4^\circ\text{C}/40^\circ\text{C}$ und 30 min 37°C , (+)/(-) Extrakte aus Bohnenrohmaterial mit und ohne gentechnischer Veränderung.

Tabelle 12 dargestellt.

Tab. 12: Gesamtproteingehalte für die hergestellten Extrakte aus Bohnenrohmaterial mit (+) und ohne (-) gentechnischer Veränderung.

Spur	Probe/Bedingungen	Proteingehalt [mg/mL] Abb. 21 a H ₂ O/PBS-Extr.	Proteingehalt [mg/mL] Abb. 21 b PBS-Extr.
1	(+)/4 h 4 °C; lyoph.	1,05	10,0
2	(-)/4 h 4 °C; lyoph.	2,55	6,87
3	(+)/4 h 40 °C; lyoph.	1,69	8,53
4	(-)/4 h 40 °C; lyoph.	2,44	9,67
5	(+)/1h 37 °C	9,98	9,91
6	(-)/1h 37 °C	8,74	10,8
7	(+)/30 min 37 °C	11,60	9,15
8	(-)/30 min 37 °C	10,5	10,8
9	(+)/(-) 30 min 37 °C	9,97 PBS !!	9,52 PBS !!

(+) RR[®]-Sojabohnen (Lot-Nr. 30/1); (-) Kontrollbohnen (Lot-Nr. 20/1)

Wie aus Abbildung 21 a und b ersichtlich ist, wurde die EPSP-Synthase in allen RR[®]-Sojabohnen (vgl. Pfeilmarkierung) nachgewiesen. Die Spuren 1 und 3 in Abbildung 21 a und b zeigen zudem, dass die Lagerstabilisierung durch Lyophilisierung nicht vorteilhaft für die Immunogenität der CP4 EPSPS war, da die detektierten Banden (gelbe Pfeile) im Westernblot nur noch schwach auftraten. Bei den PBS-Extrakten in Abbildung 21 b handelte es sich um Extrakte, die maximal 2 Wochen (Spur 6) bzw. am Tag (Spur 8) zuvor extrahiert worden waren und bei -20 °C oder über Nacht nach der Extraktion bei +4 °C im Kühlschrank gelagert wurden. Die frisch extrahierten Extrakte lassen eine deutlich höhere Intensität gegenüber den älteren Proben erkennen.

4.2.1.2 Wirkung von Pufferzusätzen und pH-Wert-Unterschieden

Um die Wirkung von Detergenzien als Pufferzusätze zu überprüfen, wurden einem Tris-haltigen Puffer 2 % SDS und 1 % DTT zugesetzt. Der Vorteil dieses Puffers bestand in seiner breiten Einsatzmöglichkeit, da er sowohl als Extraktionspuffer diente als auch in seiner Zusammensetzung dem Probenpuffer nach Laemmli (1970) entsprach und in der Gelelektrophorese Verwendung fand.

In Anlehnung an die Extraktionsmethode nach Padgett (1995) wurde das dort beschriebene Extraktionsschema mit einem borathaltigen Puffer, der Tween als Detergenz enthält, ebenfalls eingesetzt. Im Gegensatz zu den bisher verwendeten Puffern hatte der sog. „Boratpuffer“ einen pH-Wert von 9,6 und lag damit im Gegensatz zu allen anderen verwendeten Puffern im alkalischen Bereich. Laut Rogan (1992) ist dieser Puffer besonders zur Extraktion von Enzymen aus GVO Baumwoll-extrakten geeignet, wobei störende Begleitstoffe nicht mit extrahiert werden. Die

Proteinextraktion erfolgte bei 37 °C und 60 bzw. 30 min Dauer. Der direkte Vergleich der Bandenmuster und der Blots ist in Abbildung 22 a - f dargestellt.

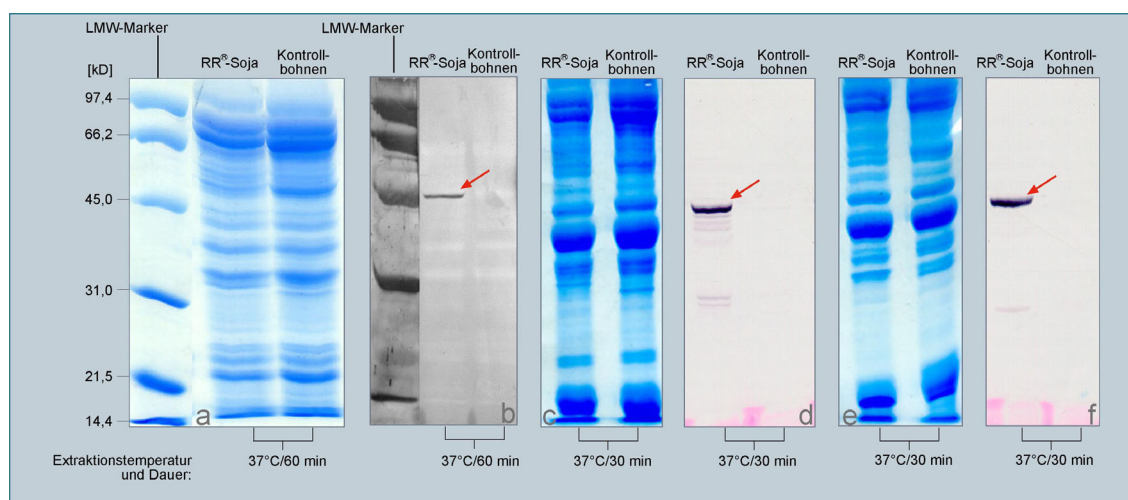


Abb. 22 a - f: 22 a + b zeigt Extrakte, die mit dem SDS- und DTT-haltigen Puffer bei 37 °C und 60 min Dauer extrahiert wurden. Die Auftragsmenge betrug 10 µg/Slot. In Abb. 22 b fand die Detektion mit dem monoklonalen Antikörper statt. Abb. 22 c + d zeigt Extrakte des gleichen Puffers mit einer Extraktionsdauer von 30 min, und diesmal wurde mit dem polyklonalen Antiserum detektiert. Abb. 22 e + f zeigt Extrakte des sog. Boratpuffers bei einer Extraktionszeit von ebenfalls 30 min und einer Detektion durch das polyklonale Antiserum.

Tab. 13: Gesamtproteingehalte für die in Abbildung 22 a - f dargestellten Extrakte aus Bohnenrohmaterial mit und ohne gentechnischer Veränderung.

Abb.	Probe/Bedingungen	Proteingehalt [mg/mL]	Proteingehalt [mg/mL]
		(+)/(-) Laemmli-Extrakte	(+)/(-) Borat-Extrakte
22 a + b	(+)(-) 60 min/37 °C	6,89/7,97	
22 c + d	(+)(-) 30 min/37 °C	4,70/5,39	
22 e + f	(+)(-) 30 min/37 °C		9,48/9,10

(+) RR®-Sojabohnen (Lot-Nr. 30/1); (-) Kontrollbohnen (Lot-Nr. 20/1)

Wie aus Abbildung 22 a, c und e ersichtlich ist, konnte auch durch den Zusatz verschiedener Detergenzien sowie mit dem alkalischen Puffer das komplette „Sojaproteinbandenspektrum“ isoliert werden. Die stärkere Bandenfärbung des Gels in Abbildung 22 c - f resultierte aus einer höheren Auftragsmenge von 20 µg Protein/0,5 cm Gel. Die maximale Beladung des Gels erfolgte im Sinne einer maximalen Detektionsausbeute der CP4 EPSPS im Westernblot, ohne die Laufeigenschaften zu beeinträchtigen.

Beim Vergleich der Abbildung 22 b und d fällt auf, dass bei der Extraktion mit denaturierenden und reduzierenden Pufferzusätzen das Zielprotein dissoziiert auftrat (22 d) und Untereinheiten durch das polyklonale Serum detektiert wurden. Im Gegensatz zum polyklonalen Antiserum (multivalente Antigenbindung) detektiert der monoklonale

Antikörper ausschließlich ein Epitop des Antigens, so dass die Abbauprodukte der CP4 EPSPS nicht mit erfasst wurden.

Da eine diskrete Bande im Blot vorgezogen wurde und ein Zusatz ab 0,005 % SDS in der Probe zu einer fehlerhaften photometrischen Proteinbestimmung führen kann, wurde auch die Extraktion mit dem SDS-haltigen Puffer nicht weiter verfolgt. Der Borat-Puffer wurde aufgrund der guten Ergebnisse und seines pH-Bereiches für spätere Versuche bei unterschiedlichen Lebensmittelmatrices ausgewählt.

4.2.1.3 Verhältnis zwischen Probe und Extraktionspuffer

Bei den bisherigen Versuchen fanden alle Extraktionen im Verhältnis von 1:10 zwischen Probe und dem Extraktionspuffer statt. Gemäß Padgett (1995) ist ein Verhältnis von 1:100 zwischen Puffer und Untersuchungsgut zur Extraktion der CP4 EPSPS optimal geeignet. Rogan *et al.* (1992; 1999) schlägt für den Nachweis der CP4 EPSPS im Westernblot ein Extraktionsverhältnis von 1:50 vor. Daraufhin wurden zunächst orientierende Versuche mit Verhältnissen von 1:5; 1:20; 1:50 und 1:100 und den 5 bisher verwendeten Puffern durchgeführt. Die Extraktionsparameter entsprachen den adaptierten Methoden von 30 min Inkubation bei 37 °C. Die Proteinausbeute der einzelnen Extraktionen mit den verschiedenen Puffern und Verhältnissen wurde mit der Methode nach Bradford (1976) bestimmt. Da die mit unterschiedlichen Puffern bei gleichen Extraktionsverhältnissen ermittelten Proteingehalte eng korrelierten, sind die Ergebnisse in Tabelle 14 als Mittelwerte der eingesetzten Verhältnisse zusammengefasst.

Tab. 14: Relation zwischen dem Proteingehalt und dem Extraktionsverhältnis von Probe und Puffer.

Extraktionsverhältnis	Ø Proteingehalt mg/mL	Probeneinwaage
1:5	12	300 mg/1500 mL
1:20	5	75 mg/1500 mL
1:50	1,5	30 mg/1500 mL
1:100	0,9	15 mg/1500 mL

Im Westernblot wurde die Qualität der Immunreaktion verschiedener Verhältnisse durch den Vergleich der Intensitäten abgeschätzt. Die Extraktionsverhältnisse von 1:5 und 1:20 erforderten, wie auch die vorherigen Versuche mit Extraktionsverhältnissen von 1:10 zeigten, starke Verdünnungen der Extrakte, um Gelüberladungen zu vermeiden (Ergebnisse nicht gezeigt). Ebenfalls war eine Übersättigung des Puffers und eine Verminderung der Extraktionseffizienz bei einem Verhältnis < 1:20 nicht auszuschließen (Rogan *et al.*, 1992). Ein besseres Extraktionsverhältnis für

Westernblotanalysen wurden mit 1:50 und 1:100 von Gewebe zu Puffer ermittelt. Als Bewertungskriterien fungierten die Qualität der Immunreaktion und der Proteingehalt. Die Beurteilung der Extraktqualität mit Verhältnissen von 1:50 und 1:100 von Bohnenrohmaterial und zusammengesetzter Ölsaatenmehle sowie eines Biskuitriegels mit und ohne RR[®]-Sojaanteilen erfolgte im Westernblot. Die resultierenden Ergebnisse sind in den Abbildungen 23-26 dargestellt.

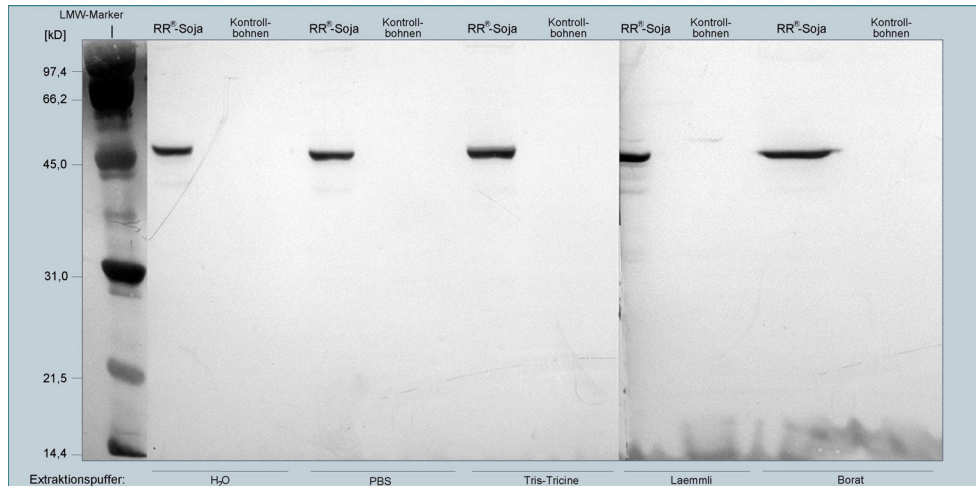


Abb. 23: Extraktionsverhältnis von 1:50 von Gewebe zu Puffer zur Extraktion von Bohnenrohmaterial. Zur Extraktion wurden alle 5 Puffer eingesetzt. Die in den Gelen aufgetragene Proteinmenge betrug durchschn. 5 µg/Slot. Da pro Gel nur 10 Spuren möglich waren, musste die Untersuchung mit 2 Gelen/Membranen erfolgen, die in der Abbildung zusammengestellt wurden.

Abbildung 23 zeigt den Westernblot von Bohnenrohmaterial bei einem Verhältnis von 1:50 mit allen verwendeten Puffern. In Analogie zeigt Abbildung 24 den direkten

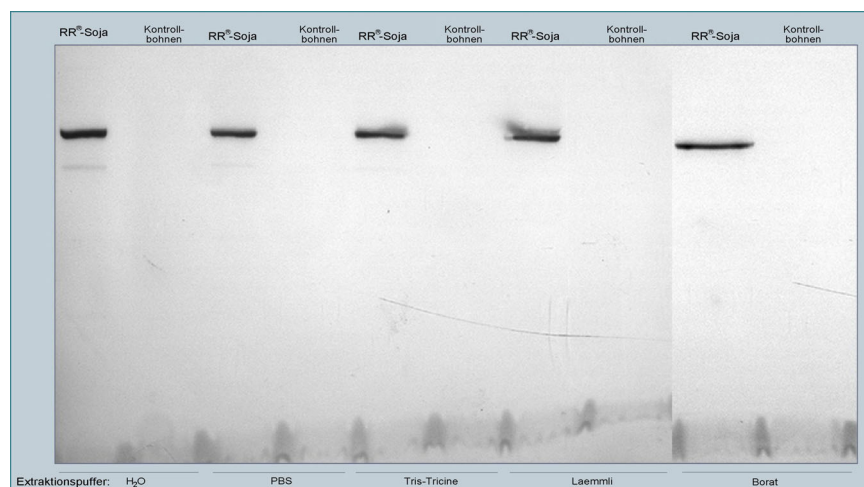


Abb. 24: Extraktionsverhältnis von 1:100 von Gewebe zu Puffer zur Extraktion von Bohnenrohmaterial. Zur Extraktion wurden alle 5 Puffer eingesetzt. Die in den Gelen aufgetragene Proteinmenge betrug durchschn. ebenfalls 5 µg/Slot. Da pro Gel nur 10 Spuren möglich waren, musste die Untersuchung mit 2 Gelen/Membranen erfolgen, die in der Abbildung zusammengestellt wurden.

Vergleich mit einem Verhältnis von 1:100 für die Extraktion von Bohnerohmaterial mit und ohne RR[®]-Soja. Bei der Ausprägung der Banden war kein Unterschied zu erkennen, so dass auch bei diesem Verhältnis von einer vollständigen Extraktion auszugehen war.

Die Auswirkung der unterschiedlichen Extraktionsverhältnisse wurde im Anschluss an zusammengesetzten und prozessierten Lebensmitteln untersucht. Abbildung 25 a und b zeigt den Westernblot eines zusammengesetzten Ölsaatenmehls bestehend aus Soja- und Maismehl (vgl. 3.1.9) jeweils extrahiert mit einem Verhältnis von 1:50 und 1:100 mit einem Anteil an 50 % RR[®]-Soja.

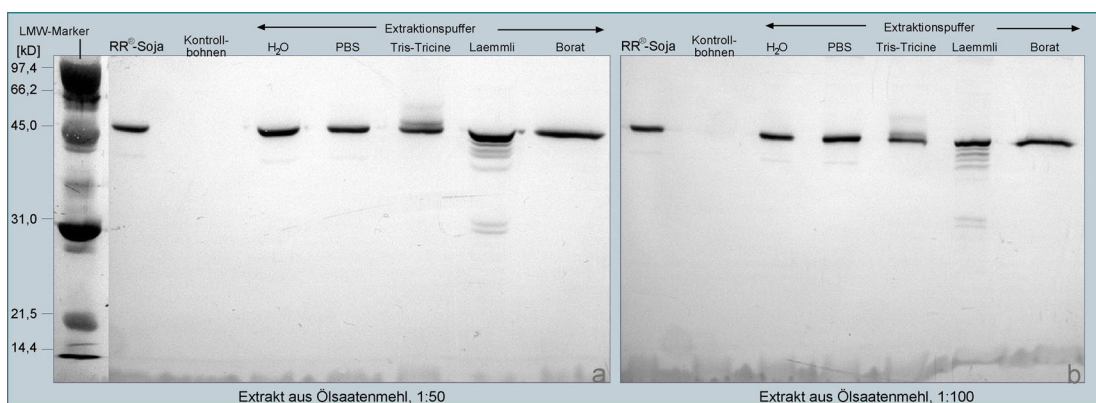


Abb. 25 a + b: Westernblot eines zusammengesetzten Ölsaatenmehls mit einem Anteil an 50 % RR[®]-Soja. a) Extraktion mit einem Verhältnis von 1:50, b) Verhältnis von 1:100.

In Abbildung 26 a + b sind abschließend die Extraktionsverhältnisse von 1:50 und 1:100 für die Proteinextraktion an einem Biskuitriegel mit zugesetztem Sojamehl dargestellt.

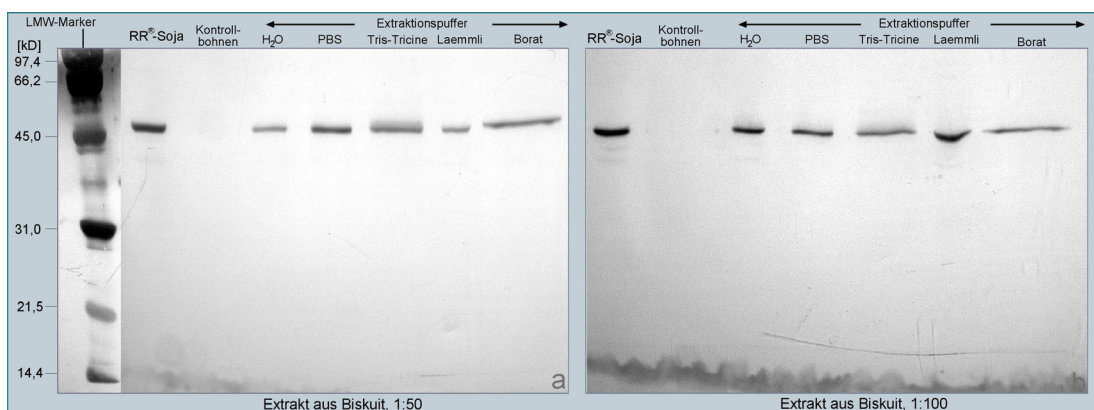


Abb. 26 a + b: Westernblot eines zusammengesetzten Biskuitriegels mit einem unbekannten Anteil an RR[®]-Soja. a) Extraktion mit einem Verhältnis von 1:50, b) Verhältnis von 1:100.

Wie schon bei der Detektion CP4 EPSPS in Abbildung 22 b und d führte auch hier die Verwendung des Laemmli-Puffers zu einer stärkeren Dissoziation der CP4 EPSPS unter

den reduzierenden Bedingungen der Probenextraktion. Das optimale Extraktionsverhältnis sollte unter Betrachtung der Zusammensetzung der zukünftig zu untersuchenden Matrix, und um eine Überladung des Gels mit Proteinen anderer Herkunft zu vermeiden, zwischen den Verhältnissen von 1:50 und 1:100 liegen.

4.2.2 Zusammenfassung der Extraktionsergebnisse

Mit allen fünf verwendeten Puffersystemen konnten aus dem Bohnenrohmaterial und den eingesetzten Lebensmitteln sowohl die sojaspezifischen Proteinkomponenten als auch, wenn vorhanden, die CP4 EPSPS extrahiert werden. Die Qualität der Extrakte wurde sowohl über die Bandenbeschaffenheit als auch über die gemessenen Proteingehalte und die Detektion im Westernblot überprüft. Die Erhöhung der Extraktionstemperatur führte zu einer verstärkten Proteinextraktion (vgl. Abb. 18), die aber für die qualitative Bewertung im Westernblot keine Bedeutung hatte. Die Extraktionsdauer variierte zwischen 30 min und 4 h und zeigte geringe Auswirkungen auf den Proteingehalt, so dass eine Extraktionsdauer von 30 min bei 37 °C als reproduzierbare Parameter festgelegt wurden. Die ermittelten Proteingehalte lagen auch bei den unterschiedlichsten Parameterwechseln im Durchschnitt bei Gehalten zwischen 6,5 mg/mL – 11 mg/mL. Da die optimale Gelbeladung für 0,75 mm starke PAA-Gele zwischen 5-12 µg Protein/0,5 cm Gel liegt, und eine Überladung der Gele die Laufeigenschaften negativ beeinflusst, mussten die optimalen Mengen durch geeignete Verdünnungen eingestellt werden.

Bei der Ermittlung des optimalen Extraktionsverhältnisses ist zunächst auf eine Rate > 1:40 zu achten, die aber bedenkenlos zwischen 1:50 und 1:100 variieren kann.

Da mit dem Assay zunächst nur ein qualitativer Nachweis der CP4 EPSPS erfolgen sollte, wurden die überprüften Parameter als ausreichend angesehen. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden H₂O, PBS und der Boratpuffer in einem Verhältnis von 1:50 zur Extraktion der CP4 EPSPS an repräsentativen Lebensmittelproben zum Vergleich mit der DNA-Analytik eingesetzt.

4.3 Expressionsklonierung der CP4 EPSPS

Zum Vergleich der Detektionsmethoden von genetisch veränderten RR[®]-Sojabohnen stand sowohl der monoklonale Antikörper der Fa. TNO nicht in ausreichender Menge als auch kein kommerziell erhältliches Antiserum gegen die CP4 EPSPS zur Verfügung. Das zu einer Immunisierung benötigte Antigen war ebenfalls nicht kommerziell

erhältlich, so dass die CP4 EPSPS als rekombinantes Protein durch Expressionsklonierung in einem bakteriellen Vektor erzeugt wurde, um im Anschluss daran New Sealand White Kaninchen zur Gewinnung von Antiseren zu immunisieren. Voraussetzung einer solchen Klonierung ist die Überprüfung der Sequenz vor der Klonierung, da durch eine mögliche Verschiebung des Leserahmens eine nicht zum Template identische Nukleinsäuresequenz amplifiziert werden könnte, durch die ein inaktives oder fehlerhaftes Protein exprimiert würde.

4.3.1 Ermittlung und Überprüfung der Sequenz der CP4 EPSPS

Nach einer Sequenzdatenbankrecherche mit NCBI/Entrez/Nucleotide bzgl. der verschiedenen, in den herbizidtoleranten Sojabohnen verwendeten, regulatorischen Abschnitte (vgl. 2.2.2.1) und einer Überprüfung der Sequenzdaten aus den U.S. Patenten 4,769,061 (Calgene Inc, 1988) und U.S. Patent 5,627,061 (Monsanto Company, 1997) lagen verschiedene Sequenzinformationen für den Bereich zwischen den Bp 390 und 2267 (vgl. Abb. 7) vor. Mit den Primerpaaren p35s-f2/petu-r1 (Methode L.23.01.22-1 gemäß § 35 LMBG, 1998), RR01/RR02 und RR04/RR05 (Köppel, 1997) und NOS 1/NOS 3 (Pietsch *et al.*, 1997) wurden zunächst Sequenzbereiche identifiziert und verifiziert.

Zur Sequenzierung des Gesamtkonstruktes (2267 Bp, vgl. Abb. 23) aus Bohnenrohmaterial mussten mit Hilfe des Programms PrimerExpressTM insgesamt 12 Primer (vgl. 3.1.5) entwickelt werden, da pro Sequenzierung nur 300-400 Bp sequenziert werden können. Die gesamte Sequenz wurde mit Strang und Gegenstrang überlappend sequenziert, um Informationsverluste, die durch die Primerbindungsstellen entstehen und bei der Sequenzierung fehlten, zu erfassen.

Die ermittelten DNA-Sequenzen wurden mit den Ergebnissen der Datenbankrecherche mit Hilfe des Programms MacVectorTM verglichen und so die Sequenz des in die Sojabohnen inserierten Konstruktes abgeglichen. Die Lokalisation der Primer und die ermittelte Sequenz sind in den folgenden Abbildungen 27 und 28 dargestellt. Die ermittelte Sequenz der CP4 EPSPS (vgl. Abb. 28) hatte die erwartete Größe von 1367 Bp (Padgett *et al.*, 1995).

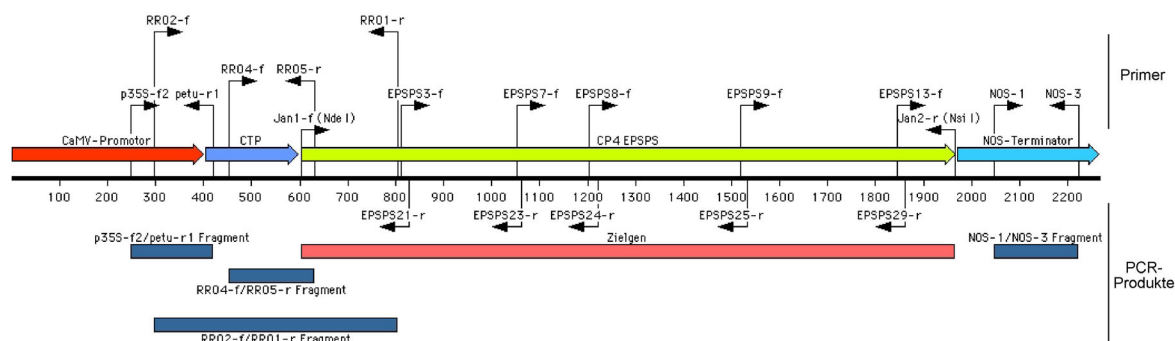


Abb. 27: Detailschema des in die Roundup Ready Sojabohne inserierten Konstruktes mit der Lokalisation aller in dieser Arbeit verwendeten Primer. Weiterhin dargestellt sind die in der PCR entstehenden Fragmente sowie die Sequenz der CP4 EPSPS (hellgrün) für die Expressionsklonierung.

```

CGATGTGAGA CTTTTCAACA AAGGGTAATA TCCGGAAACC TCCTCGGATT CCATTGCCCA 60
GCTATCTGTC ACTTTATTGT GAAGATAGTG GAAAAGGAAG GTGGCTCCTA CAAATGCCAT 120
CATTGCGATA AAGGAAAGGC CATCGTTGAA GATGCCTCTG CCGACAGTGG TCCCAAAGAT 180
GGACCCCCAC CCACGAGGAG CATCGTGGA AAAGAAGACG TTCCAACCAC GTCTTCAAAG 240
CAAGTGGATT GATGTGATAT CTCCACTGAC GTAAGGGATG ACGCACAATC CCACTATCCT 300
TCGCAAGACC CTTCTCTAT ATAAGGAAGT TCATTTTCATT TGGAGAGGAC ACGCTGACAA 360
GCTGACTCTA GCAGATCTTT CAAGAATGGC ACAAATTAAC AACATGGCTC AAGGGATACA 420
AACCCTTAAT CCCAATTCCA ATTTCCATAA ACCCAAGTT CCTAAATCTT CAAGTTTCT 480
TGTTTTTGA TCTAAAAAAC TGAAAAATTC AGCAAATCTT ATGTTGGTTT TGAAAAAAGA 540
TTCAATTTTT ATGCAAAAAGT TTTGTTCTTT TAGGATTTCA GCATCAGTGG CTACAGCCTG 600
CATGCTTCAC GGTGCAAGCA GCCGGCCCGC AACCGCCCGC AAATCCTCTG GCCTTTCCGG 660
AACCCTCCGC ATTCCCGGCG ACAAGTCGAT CTCCACCGG TCCTTCATGT TCGGCGGTCT 720
CGCGAGCGGT GAAACGCGCA TCACCGGCCT TCTGGAAGGC GAGGACGTCA TCAATACGGG 780
CAAGGCCATG CAGGCCATGG GCGCCAGGAT CCGTAAGGAA GGCGACACCT GGATCATCGA 840
TGGCGTCGGC AATGGCGGCC TCCTGGCGCC TGAGGCGCCG CTCGATTTCTG GCAATGCCGC 900
CACGGGCTGC CGCCTGACCA TGGGCCTCGT CGGGGTCTAC GATTTCTGACA GCACCTTCAT 960
CGGCGACGCC TCGCTCACAA AGCGCCCGAT GGGCCGCGTG TTGAACCCGC TCGCGGAAAT 1020
GGGCGTGCAG GTGAAATCGG AAGACGGTGA CCGTCTTCCC GTTACCTTGC GCGGGCCGAA 1080
GACGCCGACG CCGATCACCT ACCGCGTGCC GATGGCCTCC GCACAGGTGA AGTCCGCCGT 1140
GCTGCTCGCC GGCTCAACA CGCCCGGCAT CACGACGGTC ATCGAGCCGA TCATGACGCG 1200
CGATCATACG GAAAAGATGC TGCAGGGCTT TGGCGCCAAC CTTACCGTCG AGACGGATGC 1260
GGACGGCGTG CGCACCATCC GCCTGGAAGG CCGCGGCAAG CTCACCGGCC AAGTCATCGA 1320
CGTGCCGGGC GACCCGTCCT CGACGGCCTT CCCGCTGGTT GCGGCCCTGC TTGTTCCGGG 1380
CTCCGACGTC ACCATCCTCA ACGTGCTGAT GAACCCACC CGCACCGGCC TCATCCTGAC 1440
GCTGCAGGAA ATGGGCGCCG ACATCGAAGT CATCAACCCG CGCCTTGCCG GCGGCGAAGA 1500
CGTGCGGAC CTGCGCGTTC GTCCTCCAC GCTGAAGGGC GTCACGGTGC CGGAAGACCG 1560
CGCGCCTTCG ATGATCGACG AATATCCGAT TCTCGTGTG CCGCCGCCT TCACGGAAGG 1620
GGCGACCGTG ATGAACGGTC TGGAAGAAT CTGCGTCAAG GAAAGCGACC GCCTCTCGGC 1680
CGTCGCCAAT GGCTCAAGC TCAATGGCGT GGATTGCGAT GAGGGCGAGA CGTCGCTCGT 1740
CGTGCGTGCG CGCCCTGACG GCAAGGGGCT CGGCAACGCC TCGGGCGCCG CCGTCGCCAC 1800
CCATCTCGAT CACCGCATCG CCATGAGCTT CCTCGTCATG GGCCTCGTGT CGGAAAACCC 1860
TGTCACGGTG GACGATGCCA CGATGATCGC CACGAGCTTC CCGGAGTTCA TGGACCTGAT 1920
GGCCGGGCTG GCGCGAAGA TCGAACTCTC CGATACGAAG GCTGCCTGAT GAGCTCGAAT 1980
TCGAGCTCGG TACCGGATCC AATTCCCGAT CGTTCAAACA TTTGGCAATA AAGTTTCTTA 2040
AGATTGAATC CTGTTGCCGG TCTTGCGATG ATTATCATAT AATTTCTGTT GAATTACGTT 2100
AAGCATGTAA TAATTAACAT GTAATGCATG ACGTTATTTA TGAGATGGGT TTTTATGATT 2160
AGAGTCCCGC AATTATACAT TTAATACGCG ATAGAAAACA AAATATAGCG CGCAAACCTAG 2200
GATAAATTAT CGCGCGCGGT GTCATCTATG TTACTAGATC GGGGATC 2267

```

Abb. 28: DNA-Sequenz nach der Sequenzierung. Start- und Stopcodon der CP4 EPSPS zur Integration der Restriktionsschnittstellen wurden unterstrichen.

4.3.2 Insertion von Restriktionsschnittstellen in das Zielgen

Um die CP4 EPSPS zur Vervielfältigung in den Vektor integrieren zu können, musste diese mit dem Vektor sog. kompatible Überhänge besitzen. Dazu wurde vor die Startsequenz (ATG) des Zielgens und vor das Stopcodon der Transskription (TGA) durch Primerextension mittels PCR Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Nsi* I und *Nde* I eingefügt. Die Isolierung der DNA für die CP4 EPSPS codierende Sequenz erfolgte aus gentechnisch veränderten Sojabohnen mittels CTAB-Methode. Um sicherzustellen, dass die Restriktionsenzyme schneiden, muss am 5'-Ende der jeweiligen Zielsequenz ein Basenüberhang von mind. 6 Basenpaaren bestehen. Die eingesetzten Primer mit den entsprechenden Schnittstellen für die Restriktionsenzyme sind in Abbildung 29 dargestellt.

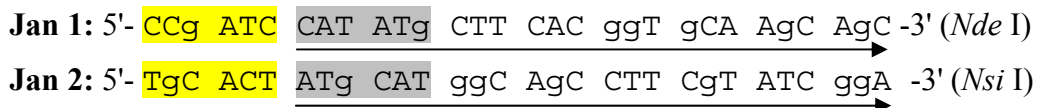


Abb. 29: Verwendete Primer (Jan 1 und Jan 2, vgl. 3.1.5), um die markierten Restriktionsschnittstellen in die CP4 EPSPS zu integrieren. Die benötigten Basenüberhänge sind gelb markiert.

4.3.2.1 Optimierung der PCR-Bedingungen

Einen großen Einfluss auf die Qualität des gesuchten PCR-Amplifikates hatte die optimale Annealingtemperatur der Primer sowie die verwendete MgCl_2 -Konzentration. Zum Einfügen der Schnittstellen mussten die Bedingungen der PCR optimiert werden, da eine zu hohe Zyklenzahl und eine zu hohe Magnesiumkonzentration im Mastermix zu unspezifischen Amplifikaten und zum Mismatching der Primer bei der PCR führen können (Newton und Graham, 1995). Aufgrund der Größe des erwarteten Amplifikates (1369 Bp) wurde u.a. auch das Expand 20 kb^{PLUS} PCR System der Fa. Roche zur Bereitstellung der Ziel-DNA verwendet. Dieses System ist besonders geeignet, um größere Fragmente bis zu 20 kB zu amplifizieren. Die Abbildungen 26 und 27 zeigen die Ergebnisse aus den Versuchen zur Ermittlung optimaler PCR-Bedingungen wie der MgCl_2 -Konzentration und der Annealingtemperatur sowie der Anzahl der PCR-Zyklen für die Primer Jan 1 und Jan 2 zur Insertion der Restriktionsschnittstellen in die Zielsequenz. Tabelle 15 gibt die Auftragung der einzelnen PCR-Produkte in den verschiedenen Gelspuren wieder. Abbildung 30 a zeigt die Ergebnisse einer PCR mit Hilfe der *Taq*-Polymerase und einer Annealingtemperatur von 65 °C und 30 sowie 35

Zyklen. In Abbildung 30 b sind die Ergebnisse einer PCR mit dem Expand 20 kb^{PLUS} PCR System und einem Temperaturgradienten im Eppendorf Mastercycler zwischen 64 °C und 65,5 °C bei 30 Zyklen dargestellt.

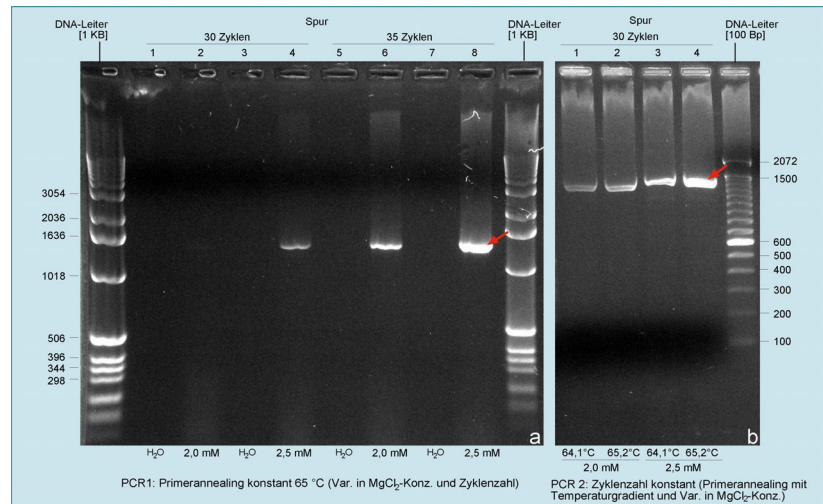


Abb. 30 a + b: Agarosegel (1,5 %) zur Überprüfung optimaler PCR-Bedingungen mit dem erwarteten Amplifikat bei 1369 Bp. Die roten Pfeile markieren die ermittelten optimalen Bedingungen.

Generell konnten nur Amplifikate erhalten werden, wenn an die Nucleinsäure-Extraktion aus den Sojabohnen eine Säulenaufreinigung angeschlossen wurde. Die Aufarbeitung wurde dahingehend modifiziert. Wie aus der Abbildung 30 a und b (markiert durch die roten Pfeile) ersichtlich ist, lag die optimale Annealingtemperatur bei 65 °C, die MgCl₂-Konzentration bei 2,5 mM und die Anzahl der PCR-Zyklen bei 35 (Spur 8, Abb. 30 a). Bei der Verwendung der *Taq*-Polymerase müssten bei 30 PCR-Zyklen Verluste an Amplifikatausbeute in Kauf genommen werden (schwächeres Amplifikat, Spur 4 Abb. 30 a).

Um das Risiko des Einbaus von Fehlbasen zu minimieren, wurde versucht, die Anzahl der Zyklen bei einer gleichbleibend hohen Amplifikatausbeute auf 30 Zyklen zu reduzieren und das System mit dem Expand 20 kb^{PLUS} PCR erneut überprüft. In Abbildung 30 b sind die Ergebnisse der PCR mit 30 Zyklen, einer MgCl₂-Konzentration von 2,5 mM sowie einer Annealingtemperatur von 65 °C dargestellt. Nach allen durchgeführten Versuchen erwiesen sich diese Bedingungen als reproduzierbar und universell verwendbar. Da es sich um ein Amplifikat > 1 kb handelte, musste mit der Verwendung einer höheren MgCl₂-Konzentration zugunsten der geringeren Zyklenzahl gerechnet werden. Ab dem 10. Zyklus empfiehlt es sich, die Elongationszeit pro Zyklus um 5 sec zu erhöhen.

4.3.3 Überprüfung der Zielsequenz

Im Anschluss an die Insertion der Schnittstellen wurde eine Sequenzierung zur Verifizierung des amplifizierten Abschnittes und zum Ausschluss von Fehlbasen angeschlossen. Abbildung 31 macht deutlich, dass mit den zuvor optimierten PCR Bedingungen die reproduzierbare Integration und Bereitstellung des Zielfragmentes möglich war. Die Mengenabschätzung der Ziel-DNA wurde zur Berechnung erforderlicher Mengen vor der Sequenzierungsreaktion gegenüber einem äquimolaren DNA-Standard durchgeführt. Nach 100%iger Übereinstimmung der ermittelten Sequenzen mit den zuvor ermittelten Daten (vgl. Abb. 28) wurde mit der Klonierung der CP4 EPSPS in die pQE Vektoren begonnen.

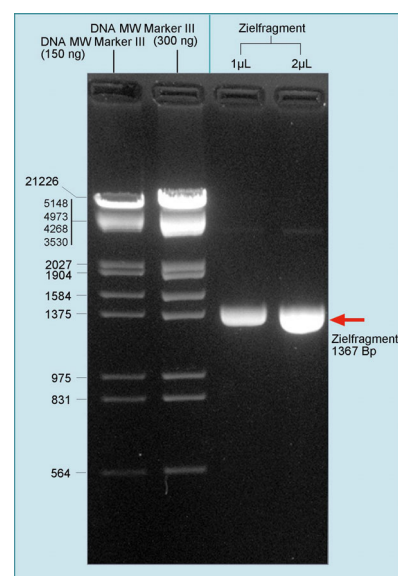


Abb. 31: Erfolgreiche Integration der Restriktionsschnittstellen in das Zielfragment. Das Amplifikat wurde zur Mengenabschätzung vor der Sequenzierung mit einem äquimolaren Längenstandard verglichen und die benötigte Menge errechnet (vgl. 3.4.3.2).

4.3.4 Klonierung der rekombinanten CP4 EPSPS

Abbildung 32 zeigt die Plasmide pQE-90s und pQE-100s sowie das zu klonierende Fragment der CP4 EPSPS nach dem Restriktionsverdau zur Mengenabschätzung vor der Ligation mit dem Vektor. Die Ligation der Ziel-DNA in den Vektor sowie die Transformation der kompetenten *E. coli* erfolgte wie unter 3.4.7. beschrieben. Nach der Transformation der kompetenten Zellen wurden diese auf Ampicillin-haltigen Platten selektiert und ausgewählte Kolonien in einer „Übernacht-Kultur“ bebrütet. Um die erfolgreiche Integration der Ziel-DNA in den Vektor zu kontrollieren, wurde die Plasmid-DNA mittels einer sog. „Mini-Präparation“ extrahiert, erneut mit den Restriktionsenzymen *Nde* I und *Nsi* I geschnitten und elektrophoretisch getrennt.

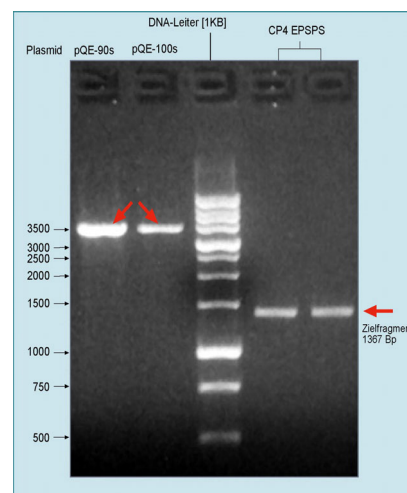


Abb. 32: Gegenüberstellung der Plasmid-DNA und des Zielfragmentes zur Abschätzung der Mengenverhältnisse vor der Ligation.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 33 a und b dargestellt. In Abbildung 33 a ist nur das leere Plasmid (Spuren 1-8, ca. 3600 Bp) aber kein Fragment (1367 Bp) wie in Abbildung 33 b zu erkennen.

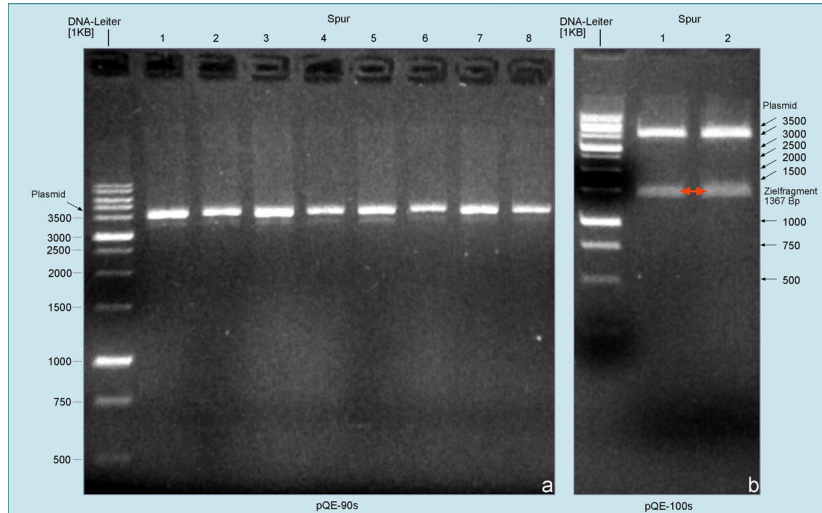


Abb. 33 a + b: Überprüfung einer erfolgreichen Integration der für die CP4 EPSPS codierenden Sequenz in die beiden verschiedenen Plasmide nach erneutem Restriktionsverdau und Isolation der Plasmid-DNA nach Mini-Präparation. Abb. 33 a Spur 1-8 pQE-90s; Abb. 33 b Spur 1 und 2 pQE-100s.

Da das Zielgen nicht in das Plasmid pQE-90s inseriert werden konnte, wurde der Versuch wiederholt (Ergebnis nicht gezeigt, da erneut nur das leere Plasmid erhalten wurde).

4.3.5 Expression der rekombinanten CP4 EPSPS

Nach der erfolgreichen Integration des für die CP4 EPSPS codierenden Sequenzabschnittes in das Plasmid pQE-100s, dargestellt in Abbildung 34, wurde LB-Selektivmedium beimpft und die rekombinanten *E. coli* Klone 100/1 und 100/2 kultiviert. Nach ausreichendem Zellwachstum wurden die Kulturen mit IPTG induziert und die Sekretion des Zielproteins vor und nach Induktion mittels SDS-PAGE (vgl. Abb. 35 a

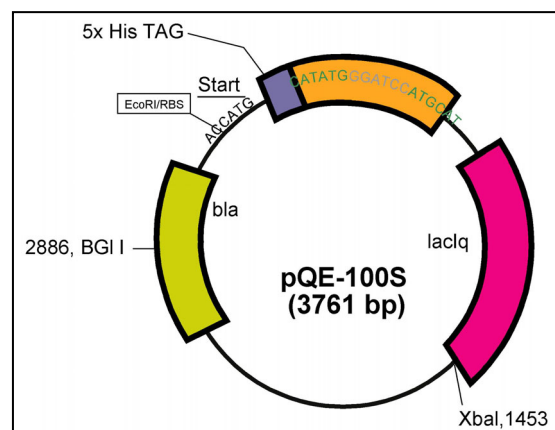


Abb. 34: Integration des für die CP4 EPSPS codierenden Sequenzabschnittes in den Vektor pQE-100S. Orange dargestellt ist der Integrationsort mit den durch Primerextension eingefügten Schnittstellen (grün) für die Restriktionsenzyme *NdeI* und *NsiI* (vgl. auch Abb. 12).

und b) überprüft. Zur Kontrolle einer fehlerfreien Expression durch *E. coli* wurde die in die Plasmid-DNA integrierte Sequenz nach der Isolierung des rekombinanten Plasmids über eine erneute Mini-Präparation extrahiert und im Anschluss durch eine

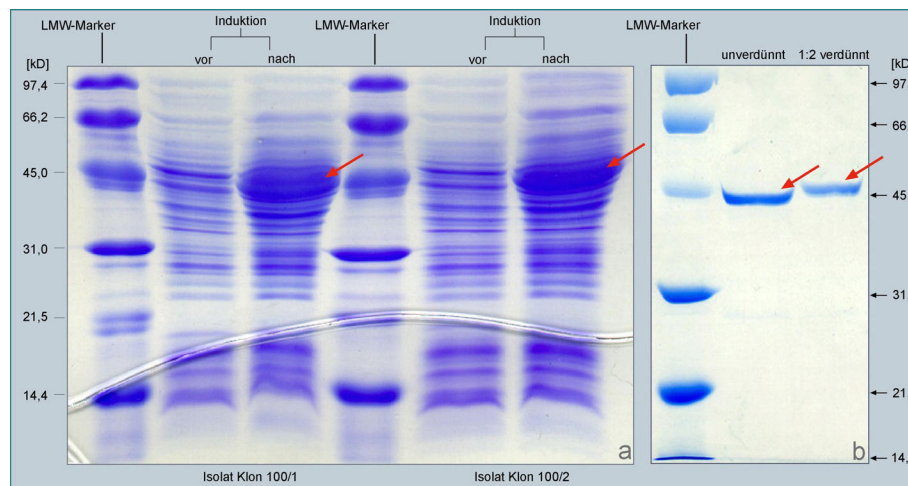


Abb. 35 a + b: Abb. 35 a zeigt die elektrophoretische Trennung von Zellextrakten im PAA-Gel vor und nach der Induktion der Expression mit IPTG, exemplarisch an Klon 100/1 und 100/2. Abb. 35 b zeigt das von den übrigen Zellbestandteilen gereinigte und konzentrierte (vgl. 3.4.8) Protein.

Sequenzierung überprüft. Das Ergebnis der Sequenzierung zeigte eine 100%ige Übereinstimmung der inserierten DNA mit der zuvor ermittelten Sequenz (vgl. 4.3.1, Abb. 27). Nach dieser Absicherung wurde die rekombinante CP4 EPSPS in ausreichenden Mengen exprimiert und, wie unter 3.4.7.12 beschrieben, mittels Adsorption an einen Metallchelatkomplex unter denaturierenden Bedingungen von den übrigen Bestandteilen nach der Lyse gereinigt.

4.4 Gewinnung der polyklonalen Antiseren

4.4.1 Immunisierung von Kaninchen

Die gereinigten Fusionsproteine wurden gegen 1x PBS dialysiert und ein Proteingehalt von 0,253 mg/mL ermittelt (vgl. auch Abb. 34 b). Da vorhandene Proteasen durch die denaturierende Reinigung mit Harnstoff zerstört werden, konnte das Protein bedenkenlos bei -20 °C ohne weitere Zusätze gelagert werden. Die Immunisierung der New Zealand White Kaninchen erfolgte im Anschluss, wie unter 3.4.9 beschrieben, mit 150 µg CP4 EPSPS pro Injektion und Tier. Vor der Immunisierung wurde den Kaninchen das sog. Präimmunserum entnommen um eine frühere Exposition der Tiere mit dem Antigen auszuschließen. Zur Überprüfung der Seren wurde den Kaninchen am

28. und 56. Tag der Immunisierungsperiode Blut entnommen. Am 60. Tag wurde durch Entbluten der Tiere ca. 50 mL Serum gewonnen.

4.4.2 Kontrolle der polyklonalen Antiseren nach 0, 28, 56 und 60 Tagen

Zu allen Zeitpunkten der Blutentnahme wurden die gewonnenen Seren mittels Westernblot auf ihre Reaktivität und auf das Erkennen der CP4 EPSPS überprüft. Dazu wurden 10 µg Protein/Slot der RR[®]-Sojabohnen und Kontrollbohnen sowie des rekombinanten Proteins mittels PAGE getrennt und geblottet. Die Präimmunseren der Kaninchen sollten, vor einer Antigenexposition keine Antikörper gegen das Antigen enthalten und im Westernblot keine Banden detektieren, um Kreuzreaktionen auszuschließen. Nach 28 Tagen war mit dem Auftreten erster Antikörper gegen die CP4 EPSPS zu rechnen. Die Ergebnisse der ersten Überprüfung zeigt die Abbildung 36 a - e. Wie erwartet detektierten die Präimmunseren der Kaninchen vor Beginn der Immunisierung keine Sojaextrakte. Auch bei der Reagenzienkontrolle in Abbildung 36 a traten keine Banden auf. Die erste Blutentnahme nach 28 Tagen zeigte die beginnende Antikörperproduktion durch die Kaninchen.

Abbildung 36 belegt eindeutig, dass die bakteriell exprimierte CP4 EPSPS immunologisch äquivalent zur der CP4 EPSPS aus RR[®]-Sojabohnen war. Beide Antiseren detektierten eindeutig die CP4 EPSPS (Spur 10 und 13) nur in den RR[®]-Sojabohnen, und das rekombinante

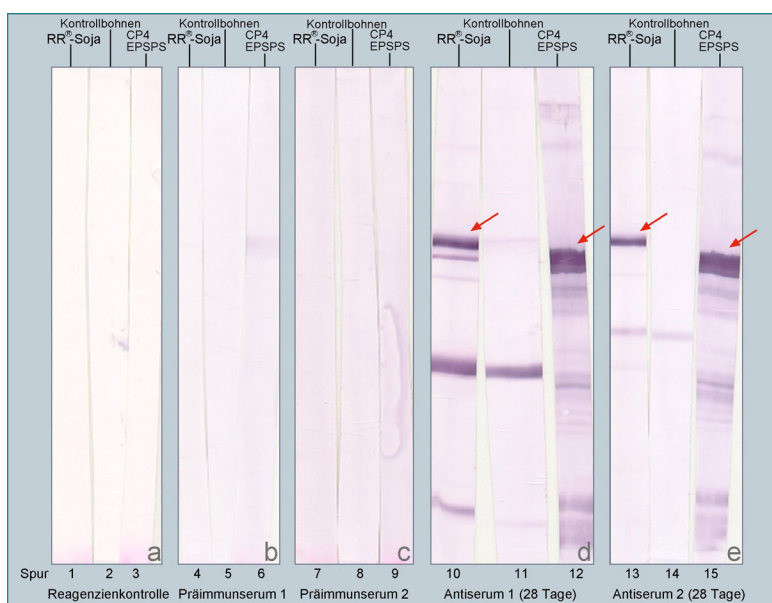


Abb. 36 a - e: Westernblot vom Präimmunserum und Seren der beiden immunisierten Kaninchen nach 28 Tagen (Verdünnung 1:2.000; sek. Ak 1:10.000). Aufgetragen wurden jeweils RR[®]-Soja, Kontrollbohnen und das rekombinante Protein.

Protein in den Spuren 12 und 15. Eine starke Bande wurde zusätzlich von Antiserum 1 bei 30 kDa in Spur 11 detektiert. Diese trat sowohl bei den RR[®]-Sojabohnen als auch bei den Kontrollbohnen auf. Die Reaktivität der polyklonalen Antiseren nach 56 und 60

Tagen ist in Abbildung 37 a - e dargestellt. Die Antiseren erkennen wie zuvor das rekombinante Protein bei 47 kDa. Die Verwendung der Kaninchenserum konnte in einer stärkeren Verdünnung von 1:5.000 erfolgen, womit eine vermehrte Antikörperbildung nach der längeren Antikörperreife zu erkennen ist. Wie in Abbildung 36 d (Spur 11) ist auch bei der Detektion der

Kontrollbohnen durch Antiserum 1 nach 56 und 60 Tagen eine Bande bei ca. 30 kDa zu erkennen, deren Auftreten bisher noch nicht eindeutig zu klären war. Diese Bande ist bei den Detektionen durch Antiserum 2 zu erkennen, allerdings sehr viel schwächer. In beiden Abbildungen ist deutlich in den Spuren 9, 12 und 15 zu erkennen, dass auch Untereinheiten des Proteins (< 47 kDa) die Antiseren binden können.

Nach dem Entbluten der

Tiere wurde daraufhin versucht, die gewonnenen Antiseren mittels HiTrap Protein A Säulen von störenden Serumbestandteilen zu reinigen. Aufgrund großer Verluste an Antiserum erwies sich die Vorgehensweise mit den verwendeten Säulen als nicht praktikabel (Ergebnisse nicht gezeigt). Eine Alternative zu der bisherigen Vorgehensweise bot sich durch die Möglichkeit am Robert-Koch-Institut in der Arbeitsgruppe von Dr. Eberhardt Hildt, (Nachwuchsgruppe 1, RKI) mit der affinitätschromatographischen Reinigung der Antiseren durch die automatisierte Immunabsorptionschromatographie mit dem ÄktaExplorer 100 System.

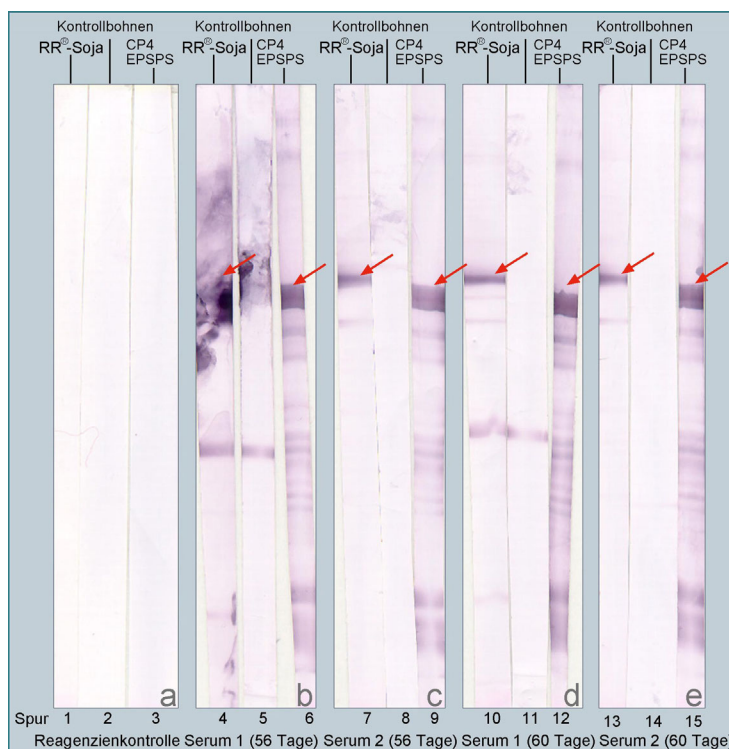


Abb. 37 a - e: Westernblot der Seren der beiden immunisierten Kaninchen nach 56 und 60 Tagen (Verdünnung ebenfalls 1:5.000). Aufgetragen wurden jeweils 10 µg Protein von RR[®]-Soja, Kontrollbohnen und des rekombinanten Proteins.

4.4.3 Affinitätschromatographische Reinigung der Antiseren

Die Isolierung der IgG-Fractionen mittels Affinitätschromatographie erfolgte, wie unter 3.10.2 beschrieben, durch die Immobilisierung des spezifischen rek. Antigens

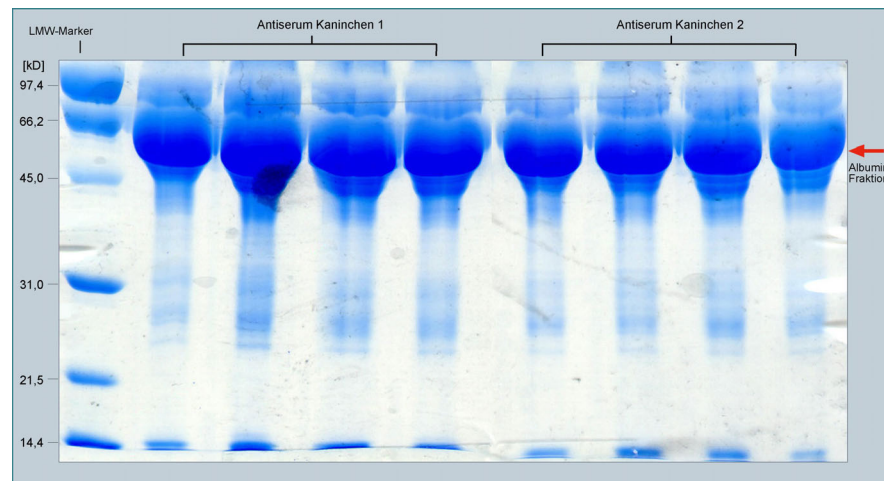


Abb. 38: Trennung der polyklonalen Kaninchenserum vor der Affinitätschromatographie in der SDS-PAGE (12%iges Gel). Die dargestellten Kaninchenserum werden durch die Albumin-Fraktion bei MG 60 kDa dominiert, die auch alle weiteren Fraktionen überlagert.

CP4 EPSPS an NHS-aktivierte Sepharose und der anschließenden Reinigung mit dem ÄktaExplorer-Chromatographie

System. Abbildung 38 zeigt die gelelektrophoretische Trennung der polyklonalen Kaninchenserum (Verdünnung 1:50) vor der Reinigung mit der dominierenden Albumin-Fraktion bei 60 kDa. Um die Auswirkungen der Abtrennung der Serumalbuminfraktion (vgl. 3.10.1) vor der Affinitätschromatographie zu untersuchen und die Immunglobuline anzureichern, wurden je 5 mL der Antiseren durch die Zugabe von 50%igem Ammoniumsulfat gefällt. Zum Vergleich wurden je 5 mL Antiserum ausschließlich steril filtriert auf die Säule gegeben.

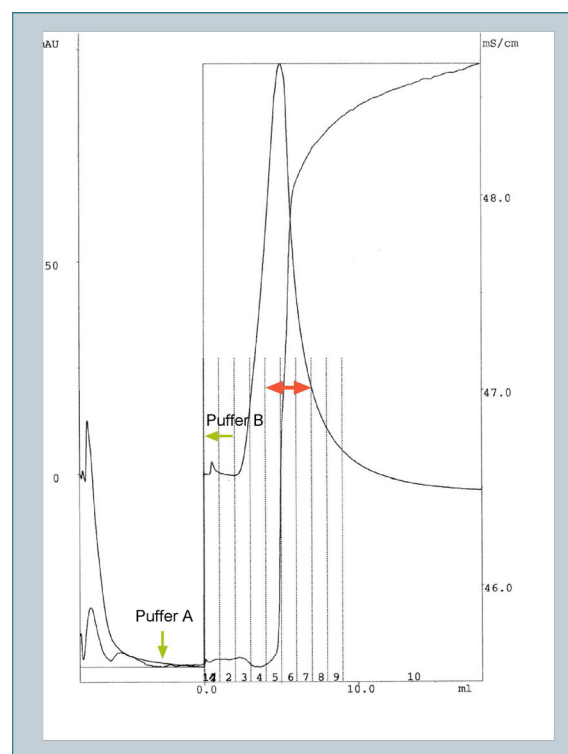


Abb. 39: Chromatogramm der Elution am Beispiel von Antiserum 2. Die Umstellung auf Puffer B führt zu einer pH-Wert Absenkung und damit zur Elution des Antikörpers von der Säule.

Zur Isolierung der Antikörper wurde die Säule bei einem pH-Wert von 8,0 mit einem Tris/NaCl-Puffer äquilibriert und mit den Antiseren beladen (Flow 0,2 mL/min). Während des Kopplungsschrittes bildeten die Aminogruppen der Sepharose mit dem Liganden (CP4 EPSPS) bei einem möglichst basischen pH-Wert stabile primäre Amine (vgl. 2.3.3.2). Die selektive Bindung des Antikörpers erfolgte bei der Säulenkonditionierung mit den Seren durch die spezifische AG-AK Reaktion. Die anderen Serumbestandteile wurden durch das Spülen der Säule entfernt. Der gereinigte Antikörper wurde anschließend durch eine pH-Wertabsenkung mit einem Glycin/NaCl-Puffer-Gemisch bei einem pH-Wert von 2 (Flow 0,1 mL/min) über einen Stufengradienten mit jeweils 9 Fraktionen à 1 mL in eine Vorlage mit NaHCO_3 eluiert. Der gesamte Ablauf der Chromatographie wurde mittels eines UV-Detektors und eines Leitfähigkeitdetektors überwacht und ist in Abbildung 39 dargestellt. Wie die Abbildung zeigt, ist die größte Menge an spezifischem Antikörper in den Fraktionen 5 bis 7 (roter Pfeil) zu erwarten. Abbildung 40 a und b zeigt die Eluate der Fraktionen 5-7 nach ihrer Trennung und Anfärbung im Gel. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der Reinigung jeweils mit und ohne vorherige NH_4SO_4 -Fällung und Abtrennung des Albumins.

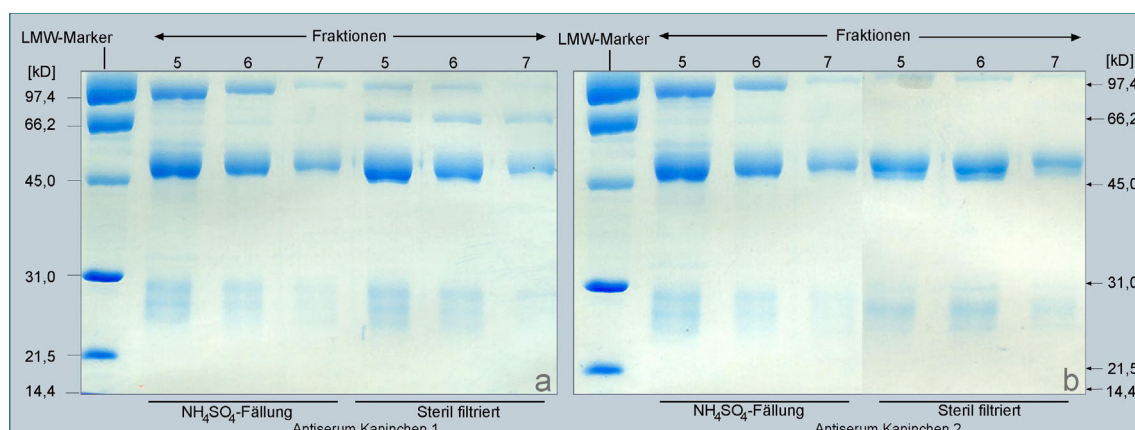


Abb. 40 a + b: Trennung der beiden Antiserenfraktionen (5-7) nach der Affinitätschromatographie in der PAGE und Anfärbung mittels Coomassie. Die größte Menge an Antikörpern wurde jeweils in den Fraktionen 5 und 6 erhalten. Die leichten (25 kDa) und schweren (51 kDa) Ketten liegen aufgrund der red. Bedingungen in der PAGE dissoziiert vor.

Die auftretenden Banden entstammen ausschließlich den Immunglobulinen, die durch die reduzierenden Bedingungen in der SDS-PAGE dissoziiert als leichte (25 kDa) und schwere Ketten (51 kDa) vorliegen. Bei den Banden in der Größenordnung > 90 kDa handelt es sich vermutlich um nicht dissoziierte Moleküle. Ein signifikanter Unterschied in der Ausbeute oder der Bandenbeschaffenheit aufgrund der zuvor durchgeführten $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung ist nicht zu erkennen.

Verglichen mit Abbildung 38 zeigt die Abbildung 40 a und b deutlich die erfolgreiche Reinigung der Antiseren. Aufgrund der guten Ausbeute an Antikörpern wurden die Fraktionen 5 und 6 (vgl. Abb. 40 a und b) nach der Reinigung vereinigt und bei weiteren Versuchen als Serumpool eingesetzt. Die Säulendurchläufe wurden

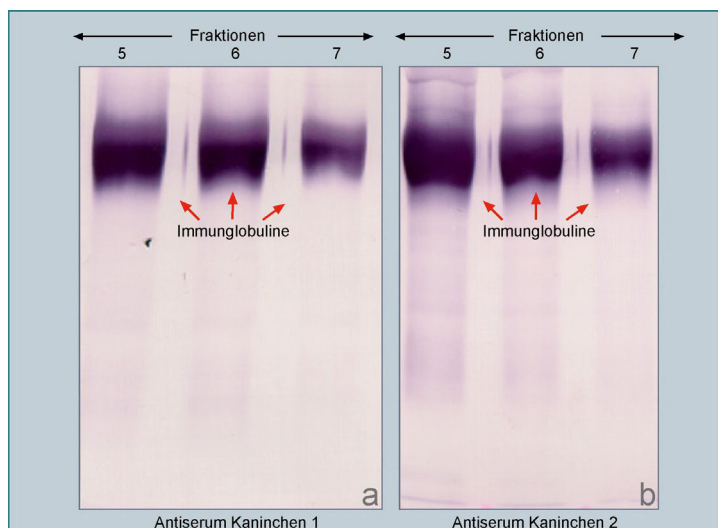


Abb. 41 a + b: Bestätigungsreaktion der Herkunft der gereinigten Eluate nach der Affinitätschromatographie. Die intensive Färbung des Westernblotes beruht auf der geringen Verdünnung des AntiRabbit-IgG von 1:2.000.

zur Kontrolle in der Elektrophorese getrennt (Ergebnisse nicht gezeigt). Zur Sicherstellung der Herkunft der gereinigten Fraktionen beider Antiseren und der Bestätigung, dass es sich um Immunglobuline handelt, wurden die Seren nochmals im Westernblot mit AntiRabbit-IgG inkubiert. Wie in Abbildung 41 a und b zu erkennen ist, sind die gereinigten Fraktionen durch das AntiRabbit-IgG detektierbar und konnten so als Immunglobuline des Kaninchens identifiziert werden.

4.4.4 Reaktivitäten der Antiseren nach der Affinitätschromatographie

Die gereinigten Antiseren wurden nach der Affinitätschromatographie mit den unbehandelten Seren bezüglich ihrer Immunreaktivitäten verglichen. Dazu wurden 10 µg Protein/Slot von Extrakten von RR[®]-Sojabohnen, Kontrollbohlen und des rekombinanten Antigens in der SDS-PAGE getrennt und geblottet. Dies ist in Abbildung 42 dargestellt.

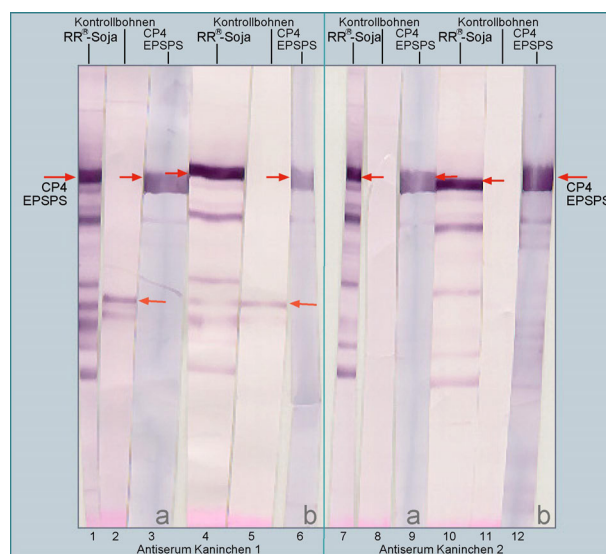


Abb. 42: Überprüfung der Reaktivitäten der Antiseren nach der Affinitätschromatographie. Die Verdünnung der Antiseren betrug 1:5.000. Die Variation der Bandenhöhe resultiert aus einer Verschiebung der Blotstreifen beim Zusammenkleben.

Die RR[®]- Sojabohnen (Spur 1, 4, 6 und 10) wurden nach wie vor sowohl von den gereinigten als auch wie bisher durch die nicht gereinigten Antiseren detektiert.

Die Kreuzreaktivität von Serum 1 mit den Extrakten sowohl aus den Kontrollbohnen als auch mit den RR[®]- Sojabohnen bei einem MG von 30 kDa hatte auch nach der AC-Reinigung bestand, wobei die Banden in Spur 5 (Serum 1) schwächer sind als in Spur 2 (Serum 1).

4.4.5 Kreuzreaktivitätsuntersuchungen

Die polyklonalen Antiseren sollten in einem Testsystem zur Detektion der CP4 EPSPS u.a. in prozessierten Lebensmitteln zum Einsatz kommen. Die genetisch veränderten Sojabohnen gehören zur Familie der *Leguminosae*, und Kreuzreaktivitäten, vermittelt durch Aminosäuresequenzhomologien (Rogan *et al.*, 1999), innerhalb von Pflanzenfamilien sind nicht auszuschließen. Demzufolge wurden beide Antiseren gegen 21 verschiedene Extrakte anderer Leguminosen sowie potentiell kreuzreagierenden Lebensmittelbestandteilen (Tab. 16) im Westernblot untersucht.

Tab. 16: Potentiell kreuzreagierende Leguminosen sowie Bestandteile zusammengesetzter Lebensmittel. Die lfd. Nummern in der Tabelle wurden in den Abbildungen 43-45 als Spurenbelegung übernommen.

Spur	Bezeichnung	Proteingehalt*/mg/mL
+	RR [®] -Sojabohnen	10
-	Kontrollbohnen	11
1	Ungarische Kürbiskerne (Rapunzel)	0,803
2	Kichererbsen (Rapunzel) – Türkei	1,56
3	Sojabohne (Rapunzel) – USA	1,449
4	Haselnuss	1,557
5	Kidney Bohne (Rapunzel) – USA	1,239
6	Walnüsse (Seeberger)	0,710
7	Californische Mandeln (Rapunzel)	1,494
8	Paranusskerne (Rapunzel) – Bolivien	1,607
9	Kokosraspel (Rapunzel) – Sri Lanka	1,009
10	Pintobohne (Rapunzel) – Türkei	1,260
11	Pistazienkerne (Rapunzel) – Türkei	0,342
12	Pinienkerne (Rapunzel) – Türkei	0,750
13	Weisse Bohnen (Toom)	1,278
14	Erbsen (Toom)	1,682
15	Gerste (Toom)	0,351
16	Naturreis (Toom)	0,652
17	Sesamsaat (Seebeger)	0,812
18	Roggen (Toom)	0,849
19	Weizen (Toom)	0,126
20	Hafer (Toom)	0,549
21	Erdnuss (nur Abb. 44 und 45)	0,329

*Der Proteingehalt wurde mit der Methode nach Bradford bestimmt.

Die Pflanzenextrakte wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Allergologie Prof. Dr. Vieths (PEI, Langen) zur Verfügung gestellt. Die verwendeten Proteinextrakte wurden mit einem 25 mM Tris-Tricine Puffer gemäß 3.1.8 extrahiert.

Die Abbildungen 43 a und b sowie 44 a - c zeigen die in der SDS-PAGE/Westernblot getrennten Proteinextrakte ($\varnothing = 5,0 \mu\text{g}$ Protein/Slot) detektiert mit Serum 1.

Wie aus Abbildung 43 a und b ersichtlich ist, erkannte das Antiserum verschiedene Komponenten aus den Proteinextrakten anderer Leguminosen (markiert durch die roten Pfeile). Besonders starke Kreuzreaktionen fanden mit Sojaproteinen (Spur 3) und Erbsenproteinen (Spur 14), sowie mit verminderter Signalintensität mit Proteinen von Kichererbsen (Spur 2), Paranüssen (Spur 8) und Reis (Spur 16) statt.

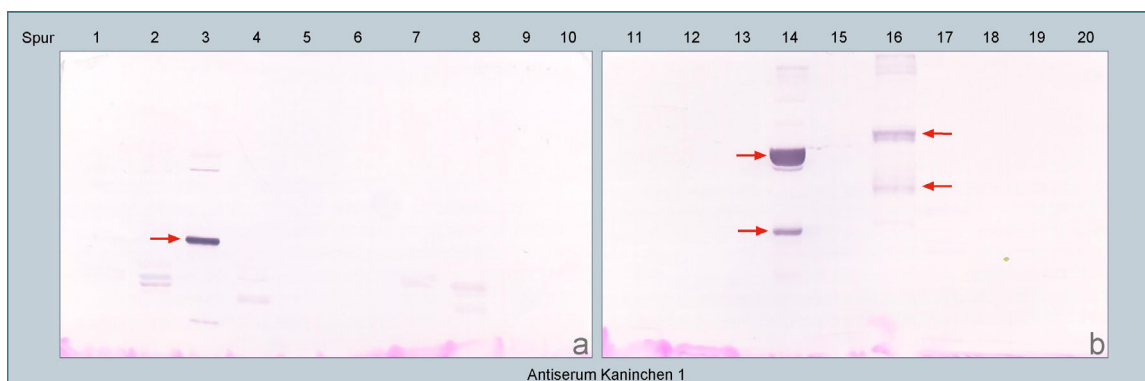


Abb. 43 a + b: Westernblot detektiert mit Kaninchenserum 1 zur Überprüfung möglicher Sequenzhomologien zu anderen Leguminosen. Spur 3 konventionelle Sojabohnen, Spur 14 Erbsen, Spur 16 Naturreis.

Bei den detektierten Banden der Größenordnung von MG 30 kDa (Soja Spur 3 und Erbse Spur 14) handelte es sich um das basische β -Polypeptid des Legumins (11S Globulin). Die Westernblot-Untersuchungen wurden nach dem Transfer auf die NC-Membranen zunächst nur mit 0,5 % Tween (vgl. 3.12.3) als Blockierungsreagenz zum Puffer durchgeführt. Nach den Ergebnissen der Kreuzreaktivitätsuntersuchungen wurde der Puffer zusätzlich mit 5 % Magermilchpulver versetzt und die Untersuchungen wiederholt.

Ergebnisse

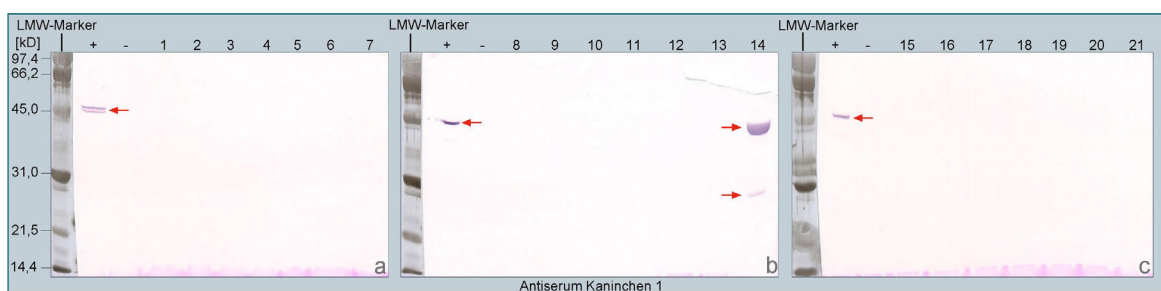


Abb. 44 a - c: Wiederholung des Westernblots mit den Proben und Antiserum 1 wie in Abb. 42 a + b. Diesmal wurde zusätzlich mit 5 % Magermilchpulver in TBS-Tween blockiert. Diverse unspezifische Reaktionen können durch das Magermilchpulver unterbunden werden. Nur der Extrakt aus Erbsen in Spur 14 wird nach wie vor detektiert.

Wie die obige Abbildung 44 a - c zeigt, konnten diverse unspezifische Reaktionen mit der Verwendung des Magermilchpulvers unterbunden werden. Allerdings blieb die starke Reaktion mit dem Erbsenextrakt in Spur 14 bestehen.

Die folgende Abbildung 45 a - c zeigt die Westernblots der Leguminosen, detektiert mit Antiserum 2. Es wurden ebenfalls durchschnittlich 5,0 µg Protein/Slot aufgetragen. Hier wurde ausschließlich mit dem Zusatz von 5 % Magermilch zum Blockierungspuffer gearbeitet, und es fanden keine Kreuzreaktionen statt.

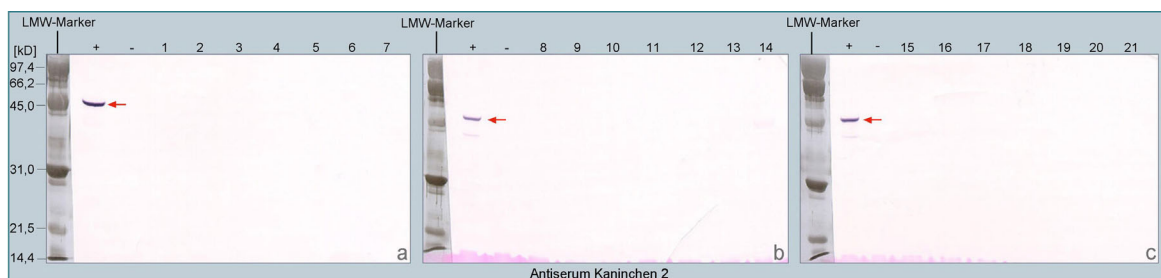


Abb. 45 a - c: Westernblot von Antiserum 2 zur Untersuchung auf mögliche Sequenzhomologien. Im Gegensatz zu Antiserum 1 fanden keine Kreuzreaktionen statt.

4.4.5.1 Zusammenfassung der Kreuzreaktivitätsuntersuchungen

Die Überprüfung der Antiseren gegenüber potentiell kreuzreagierenden Lebensmittelbestandteilen zeigte starke Kreuzreaktionen von Antiserum 1. Das Serum von Kaninchen 2 detektierte nur die gentechnisch veränderten Sojabohnen und zeigte mit allen anderen eingesetzten Extrakten keine Kreuzreaktivitäten. Als kreuzreagierende Epitope (Aminosäuresequenzhomologe) wurden die 11S sauren und basischen Polypeptide des Glycinin und Legumin identifiziert, die bei Leguminosen als Speicherproteine fungieren. Auch durch die affinitätschromatographische Reinigung wurden die Kreuzreaktionen von Serum 1 gegenüber konventionellen Sojabohnen sowie Erbsen nicht entfernt.

Die mit Antiserum 1 nach der Reinigung erzielten Resultate sowie die nachgewiesenen Kreuzreaktivitäten führten zu der Entscheidung, zur weiteren Evaluierung des Testsystems nur Antiserum 2 zu berücksichtigen.

4.4.6 Optimierung der Immunreagenzien

Bei den bisher durchgeführten Untersuchungen zur Reaktivität der polyklonalen Antiseren wurde das alkalische Phosphatase-konjugierte Anti-Kaninchen IgG laut Herstellerangaben in einer Verdünnung von 1:10.000 verwendet. Die CP4 EPSPS-spezifischen Antiseren wurden variabel in Verdünnungen von 1:2.000 – 1:10.000 eingesetzt. Die optimalen Verdünnungsparameter der eingesetzten Immunreagenzien sollten in Westernblotversuchen so eingestellt werden, dass eine ausreichend starke Verdünnung der Antiseren und des Sekundärantikörpers noch die einwandfreie Detektion der Banden im Westernblot zuließ. Die Menge an getrenntem Antigen aus RR[®]-Sojabohnenextrakt wurde konstant gehalten und betrug 5 µg Protein/cm Gel. Nach dem Transfer auf NC-Membranen wurden Streifen mit dem geblotteten Antigen jeweils mit polyklonalem Antiserum in variablen Verdünnungen von 1:5.000, 1:10.000, 1:20.000, 1:40.000, 1:80.000 und 1:100.000 inkubiert und mit dem sek. Antikörper (Anti-Kaninchen IgG, vgl. Tab. 17) in ansteigenden Verdünnungen von 1:5.000, 1:10.000, 1:20.000, 1:30.000, 1:50.000, 1:60.000, 1:80.000 und 1:100.000 detektiert.

Tab. 17: Übersicht über die in Abbildung 45 eingesetzten Anti-Kaninchen IgG und deren Verdünnungen.

Spur	Verdünnung sek. Antikörper
1	1:5000
2	1:10.000
3	1:20.000
4	1:30.000
5	1:50.000
6	1:60.000
7	1:80.000
8	1:100.000

Die Verdünnung des Antiserums von 1:5.000 wurde als Mindestverdünnung resultierend aus vorhergehenden Untersuchungen angesehen. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 46 a - f dargestellt.

In Abbildung 46 a und d befindet sich jeweils die Reagenzienkontrolle. Wie aus Abbildung 46 a ersichtlich ist, konnten mit allen Verdünnungen von 1:5.000-1:20.000 der Antiseren und Verdünnungen von 1:5.000-1:20.000 mit den sek. Antikörpern

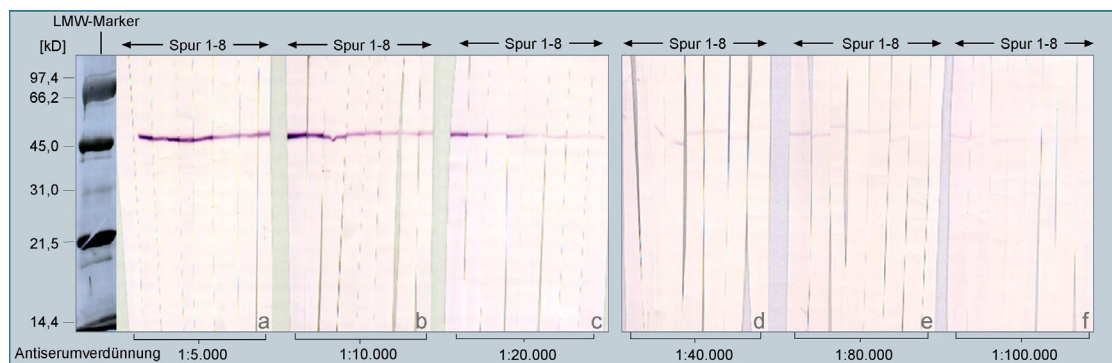


Abb. 46 a-f: Westernblot von Extrakt aus RR[®]-Sojabohnen detektiert mit polyklonalem Kaninchenserum 2 in einer Verdünnung von a) 1:5.000, b) 1:10.000, c) 1:20.000, d) 1:40.000, e) 1:80.000, f) 1:100.000. Das AntiKaninchen IgG wurde in einer aufsteigenden Verdünnung von Spur 1: 1:5.000, Spur 2: 1:10.000, Spur 3: 1:20.000, Spur 4: 1:30.000, Spur 5: 1:50.000, Spur 6: 1:60.000, Spur 7: 1:80.000, Spur 8: 1:100.000 eingesetzt.

Banden detektiert werden. Die Verdünnung des Antiserums über eine Grenze von 1:20.000 hinaus führt zu einer rapiden Verschlechterung der Immunreaktion, und das Protein ist nicht mehr ausreichend nachweisbar.

4.4.7 Sensitivität des RR[®]-Soja Nachweises

Zur Ermittlung der Sensitivität des Nachweissystems sollte der niedrigste, vom System noch detektierbare RR[®]-Soja-Anteil bestimmt werden. Durch das beim Westernblot übliche Assaydesign kann die Beurteilung nur visuell über den Vergleich der Bandendicke und der Intensitäten gegenüber Proben mit bekanntem RR[®]-Soja-Anteil erfolgen. Hierzu können lineare Verdünnungsreihen oder Dotierungsversuche Anwendung finden. Da die rekombinante CP4 EPSPS nicht ausreichend zur Verfügung stand, wurde zertifiziertes Referenzmaterial mit Anteilen von 0,1 %, 0,5 % und 1 % RR[®]-Soja im Westernblot eingesetzt. Zur Veranschaulichung der durchgeführten Versuche sind in den Abbildungen 47 a und b und 48 a und b die Ergebnisse der Westernblots dargestellt. Abbildung 47 a zeigt die Extraktion aus dem zertifizierten Referenzmaterial mit 0,1 % und 1 % RR[®]-Soja zu den etablierten Bedingungen (vgl. 4.2.2).

Ergebnisse

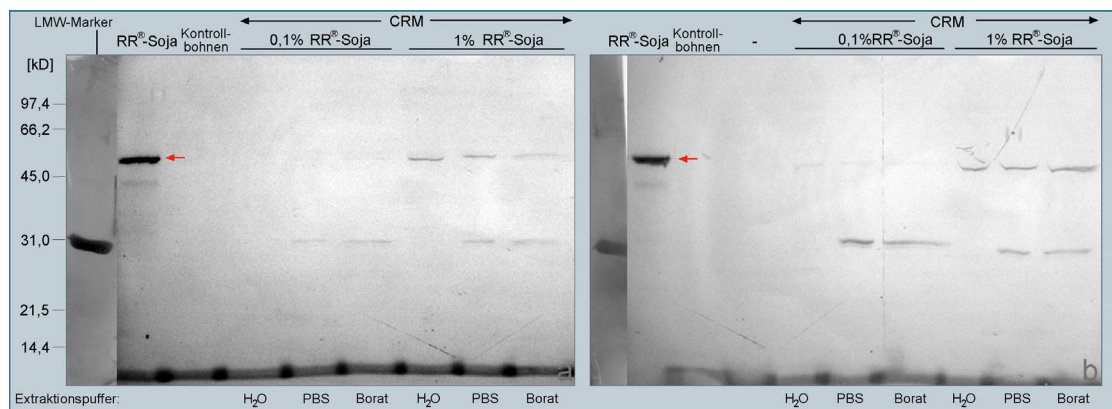


Abb. 47 a + b: Nachweis der 0,1%igen und 1%igen RR[®]-Sojamehle. Die eingesetzte Proteinmenge betrug bei Abb. 47 a \varnothing 3,0 μ g/Slot und in Abb. 47 b \varnothing 11,5 μ g/Slot. Die roten Pfeile markieren die Positivkontrolle. Die verwendeten Extraktionspuffer sind unter den Abbildungen gelistet.

Wie die Abbildungen eindeutig zeigen, erfolgte der Nachweis des 1%igen RR[®]-Sojamehls in beiden Konzentrationen problemlos, während aus dem 0,1%igen RR[®]-Sojamehl kein Nachweis gelang. Bei den in Abbildung 48 a und b dargestellten Immunoblots wurden abweichend zu den bisher etablierten Bedingungen sowohl die Proteinauftragsmenge auf \varnothing 30 μ g/Slot (a) und \varnothing 20 μ g/Slot (b) erhöht als auch im Sinne einer maximalen Proteinausbeute (vgl. 4.2.1.2) in Abbildung 48 b das Extraktionsverhältnis auf 1:10 verringert. Da es sich bei dem untersuchten Material um zertifiziertes Referenzmaterial handelte, war trotz der Änderung der Extraktionsbedingungen nicht mit Matrixeffekten zu rechnen. Aufgrund der zunächst negativen Ergebnisse mit dem 0,1%igen Sojamehl wurde zur Gegenüberstellung und als eine Art interner Schwellenwert auch 0,5%iges RR[®]-Sojamehl überprüft (Abb. 48 b).

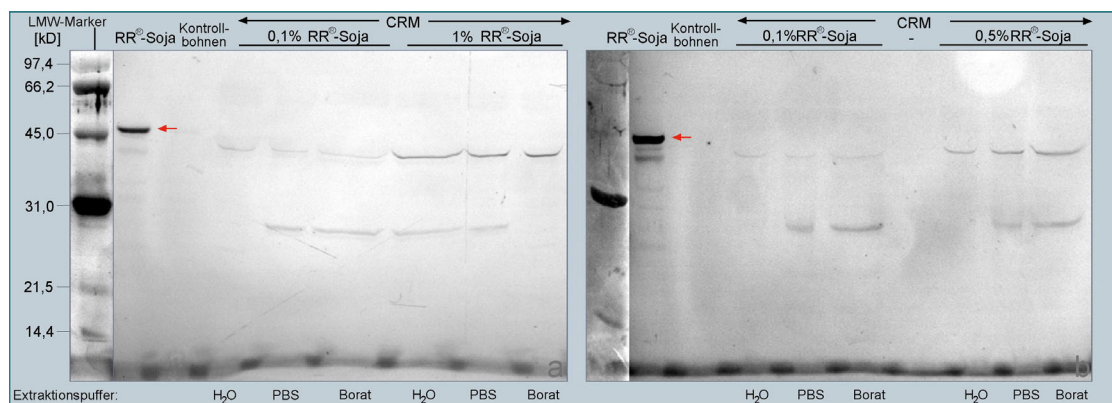


Abb. 48 a + b: Nachweis der 0,1%igen und 1%igen RR[®]-Sojamehle. Die eingesetzte Proteinmenge betrug bei Abb. 48 a \varnothing 30 μ g/Slot und in Abb. 48 b \varnothing 20 μ g/Slot. Die roten Pfeile markieren die Positivkontrolle. Die verwendeten Extraktionspuffer sind unter den Abbildungen gelistet.

Der Nachweis des 0,5%igen RR[®]-Sojamehls gelang mit den geänderten Bedingungen ebenfalls problemlos. Außerdem zeigten die Immunoblots unter den veränderten Bedingungen bei den 0,1%igen RR[®]-Sojamehlen deutlich, wenn auch schwach, Banden im Bereich von 47 kDa. Damit war das 0,1%ige RR[®]-Sojamehl ebenfalls nachweisbar und das Nachweissystem zu Aussagen bzgl. des gesetzlichen Schwellenwertes von 1 % RR[®]-Soja verwendbar.

Die nötige Auftragsmenge an Gesamtprotein zum Nachweis sehr geringer CP4 EPSPS Gehalte wurde mit maximal 20-30 µg/Slot ermittelt, was allerdings immer unter Berücksichtigung der Probenmatrix erfolgen sollte. Wie die Ergebnisse der beiden Abbildungen zeigen, ist es möglich, das Extraktionsverhältnis für Gehalte von 0,5 % RR[®]-Soja zu erhöhen. Damit wurde unter leicht geänderten Extraktionsbedingungen eine Sensitivität des Systems in Rohmaterialien von 0,1 % ermittelt, die allerdings nur als experimentelle Nachweisgrenze angesehen werden sollte. Die praktische Nachweisgrenze des Systems liegt bei 0,5 % RR[®]-Soja, da ab diesem Gehalt genügend transgenes Protein zum Nachweis vorhanden ist. Die entstandene Fragestellung bzgl. der Matrixeffekte wird u.a. im folgenden Kapitel eingehend behandelt. Die ermittelten Ergebnisse werden bzgl. der Ausrichtung des Testsystems unter Berücksichtigung des Schwellenwertes in der Diskussion (vgl. 5.6) interpretiert.

4.5 Praxisvergleich DNA-Analytik vs. Proteinassay

4.5.1 Untersuchung von Modellebensmitteln und Handelsproben

Zum Vergleich des Protein- und DNA analytischen Verfahrens wurden insgesamt 28 Proben in die Analysen eingesetzt, von denen 16 als Lebensmittel-Referenzproben im Labormaßstab bereitgestellt und 12 käuflich erworben wurden. Da Soja in Lebensmitteln in den unterschiedlichsten Verarbeitungsformen Anwendung findet (vgl. 2.1.1), sollte die Auswahl der Proben ein breites Spektrum dieser Produktvielfalt widerspiegeln und mögliche Matrixeffekte erfassen (siehe Abb. 49).

Für die quantitative Analyse und als Referenz für Nachweisgrenzen wurden die zertifizierten Sojamehle des IRMM-Institutes (vgl. 3.1.7) mit einem definierten Gehalt an RR[®]-Soja eingesetzt. Ebenso enthielt das im Labormaßstab hergestellte Tofu definierte Mengen an RR[®]-Soja. Die gentechnisch veränderten Anteile variierten zwischen 0 %, 0,1 %, 1 %, 2 %, 4%, 5 % und 100 % RR[®]-Soja.

Zwei Proben enthielten Ölsaatengemische aus Soja- und Maismehl, und zwei weitere Proben bestanden aus texturiertem Sojaprotein (2 % und 100 % RR[®]-Soja), das in Form von Fleischsurrogat oder als Proteinkonzentrat in der Lebensmittelherstellung eingesetzt wird. Texturierte (Soja-)Proteine (TVP) durchlaufen bei ihrer Herstellung die stärksten Prozessierungen, da sie mittels Extruderschnecken hergestellt werden, bei deren Anwendung sowohl 20-40%ige Natronlauge eingesetzt wird als auch hohe Drücke und Temperaturen von bis zu 120 °C vorherrschen (Kessler, 1988).



Abb. 49: Übersicht über die mit den verschiedenen Methoden untersuchten Produkte. Das Spektrum erstreckte sich von Diät-Nahrung (Proteinisolate) und Energieriegeln (Lecithin) über Sojawurstchen bis zu Tofu als Fleischersatz.

Bei 8 Proben handelte es sich um käuflich erworbene Produkte, die als gentechnisch verändert gekennzeichnet waren und Sojaverarbeitungsprodukte in Form von Proteinisolaten, -konzentraten und Lecithin enthielten (vgl. Tab. 18). Weitere 4 kommerziell erworbene Produkte enthielten lt. Zutatenverzeichnis einen hohen Anteil an Sojaproteinen, trugen aber keine Kennzeichnung hinsichtlich einer möglichen gentechnischen Veränderung.

Einen Überblick über die untersuchten Proben, unterteilt nach Herstellungsmethoden und Prozessierungen sowie der Beschaffenheit des zugesetzten Sojaproteins, gibt Tabelle 18. Die gelisteten Produkte Nr. 16; 17; 19; 20; 21; 24 und 25 enthielten lt. Zutatenverzeichnis außer Sojaproteinen auch Milchcasein zur weiteren Proteinanreicherung.

Tab. 18: Untersuchte Proben, unterteilt nach Produktkategorien und unterschiedlichen Herstellungsprozessen. Die Ölsaatenmischung sowie der Tofu und die texturierten Extrakte wurden im Labormaßstab hergestellt und waren daher nicht als GVO gekennzeichnet.

	Nr.	Probe	bek. Gehalt an RR [®] -Soja / Kennzeichnung der Handelsprobe
Ansteigender Verarbeitungsgrad der Produkte		Sojamehle (teilw. entfettet)	
	1	Sojamehl; CRM	0 %
	2	Sojamehl; CRM	0,1 %
	3	Sojamehl; CRM	0,5 %
	4	Sojamehl; CRM	1 %
	5	Sojamehl; CRM	2 %
	6	Sojamehl; CRM	5 %
	7	Sojamehl	100 %
	8	Soja- + Maismehl, Mischung A	50 %
	9	Soja- + Maismehl, Mischung B	1 %
		Vollfett-Sojamehl	
	10	Biskuit	k. A.
		Gefällte Proteine - Tofu	
	11	Tofu	0 %
	12	Tofu	1 %
	13	Tofu	2 %
	14	Tofu	4 %
	15	Tofu	100 %
		Lecithin	
	16	Energieriegel "Powerplay"	k. A. / nein
	17	Braun Sondennahrung, enthält neben Lecithin auch Sojaproteinisolate	k. A. / ja
		Proteinkonzentrate/-Isolate aus Abscheidungsprodukten (Sojaflocken) der Ölgewinnung	
	18	Soja-Schnitzel	k. A. / ja
	19	Getränkpulver "Herbalife"	k. A. / ja
	20	Diätiegel "Rum"	k. A. / ja
	21	Diätiegel "Amaretto"	k. A. / ja
	22	Sojawurst	k. A. / ja
	23	Sojagen	k. A. / nein
	24	Almased	k. A. / nein
	25	Slimfast	k. A. / nein
		Texturierte Extrakte	
	26	text. Soja 2 % (nach Extrusion)	2 %
	27	text. Soja 100 % (nach Extrusion)	100 %
	28	Taco-Fertigmischung "Sobie"	k. A. / ja
		k.A.: keine Angabe	

4.5.1.1 Nachweis der CP4 EPSPS im Westernblot

Aus allen 28 Proben wurden mit den drei etablierten Puffersystemen in einem Verhältnis von 1:50 unter den beschriebenen Extraktionsbedingungen (vgl. 4.2.2) die Gesamtproteine extrahiert und der Proteingehalt bestimmt. Im Anschluss wurden, wie

beschrieben, jeweils 5 µg Protein/Slot im SDS-Gel getrennt und im Westernblot untersucht. Stellvertretend für die in Tabelle 18 gelisteten und untersuchten Produkte sind in den nachfolgenden Abbildungen die Ergebnisse für jeweils ein Lebensmittel aus der Produktgruppe dargestellt.

Die Abbildungen 50, 51 und 52 zeigen die getrennten Extrakte nach der Detektion im Westernblot durch das polyklonale Antiserum. Allen untersuchten Proben wurden jeweils Positiv- und Negativkontrollen aus Bohnenrohmaterial gegenübergestellt.

In Abbildung 50 a sind stellvertretend für die zertifizierten Referenzmaterialien (Nr. 1-7) die Mehle mit den Anteilen von 5 % und 100 % RR[®]-Soja dargestellt, detektiert durch das polyklonale Serum. Auch aus den Mehlen mit geringeren Anteilen an RR[®]-Soja gelang die Extraktion der CP4 EPSPS in ausreichenden Mengen (vgl. vorheriges Kapitel). Abbildung 50 b zeigt die Mischung der Ölsaatenmehle aus Soja und Mais mit Anteilen von je 50 % RR[®]-Soja und 1 % RR[®]-Soja. Wie zuvor beim Bohnenrohmaterial erfolgten die Extraktionen mit den etablierten Bedingungen sowie die Detektion problemlos.

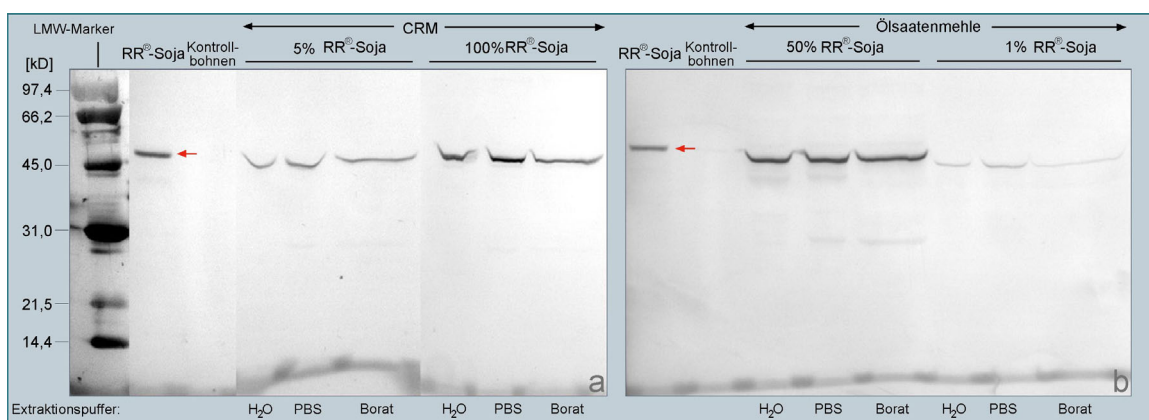


Abb. 50 a + b: Nachweis der unterschiedlich extrahierten Proteine im Westernblot. Die Verwendung der unterschiedlichen Extraktionspuffer ist unter den Blots gelistet. Spur 1/4 H₂O; Spur 2/5 0,01 M PBS; Spur 3/6 Boratpuffer. Probenverteilung Blot a: Spur 1-3 Sojamehl, CRM mit 5 % RR[®]-Soja, Spur 4-6 Sojamehl, CRM mit 100 % RR[®]-Soja. Blot b: Spur 1-3 Ölsaatenmehl mit 50 % RR[®]-Soja, Spur 4-6 Ölsaatenmehl mit 1 % RR[®]-Soja.

In den folgenden Abbildungen sind die Ergebnisse der Westernblots für die Proben mit einem stärkeren Prozessierungsgrad dargestellt.

Während die Detektion der CP4 EPSPS im Biskuit (Nr. 10) mit angereichertem Sojamehl eindeutig war, konnte über eine mögliche gentechnische Veränderung des Sojaschnitzels (Nr. 19) keine Aussage gemacht werden.

Ebenso gelang ein Nachweis der CP4 EPSPS bei dem mit unterschiedlichen Gehalten an RR[®]-Soja im Labormaßstab hergestellten Tofu (Nr. 12-15) nicht.

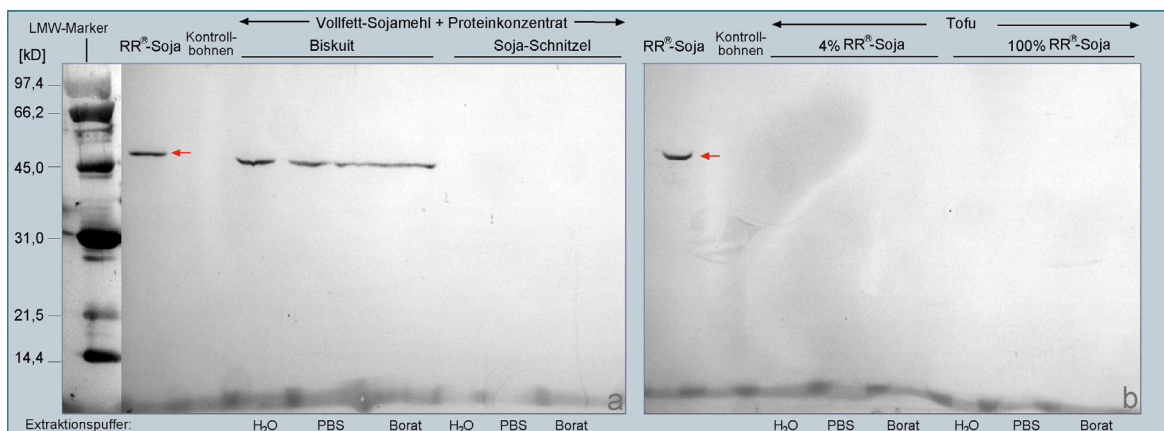


Abb. 51 a + b: Nachweis der unterschiedlich extrahierten Proteine im Westernblot. Spur 1/4 H₂O; Spur 2/5 0,01 M PBS; Spur 3/6 Boratpuffer. Probenverteilung Blot a: Spur 1-3 Biskuit, Spur 4-6 Soja-Schnitzel. Blot b: Spur 1-3 Tofu 4 % RR[®]-Soja, Spur 4-6 Tofu 100 % RR[®]-Soja.

In Abbildung 52 a sind stellvertretend für Produkte mit Sojaproteinkonzentraten und Lecithin ein sojahaltiges Getränkpulver (Nr. 20) sowie ein Energieriegel (Nr. 16) dargestellt. Abbildung 52 b zeigt texturierte Extrakte (TVP, Nr. 26 und 27) mit Anteilen von 2 % und 100 % RR[®]-Soja im Westernblot. Auch hierbei handelt es sich um Produkte, die Sojaproteine in stark verarbeiteter Form enthalten. Der Nachweis einer möglichen gentechnischen Veränderung durch die Detektion der CP4 EPSPS war nicht möglich.

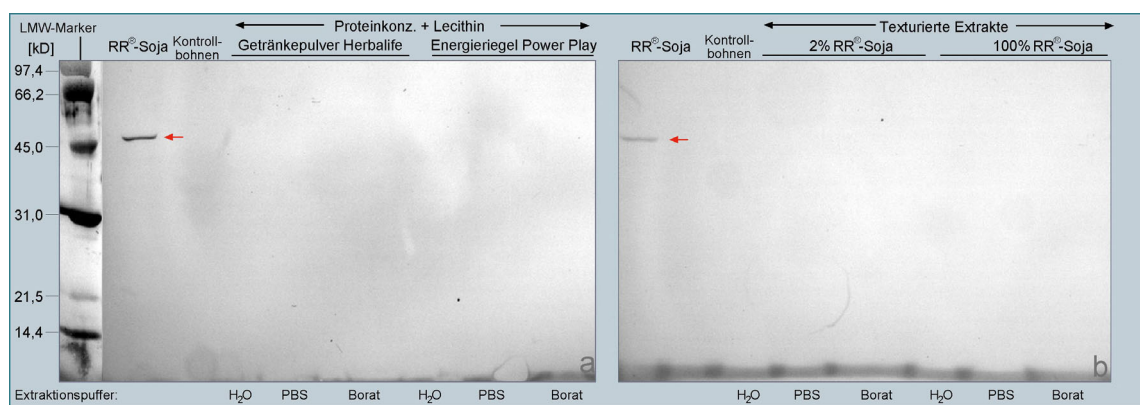


Abb. 52 a + b: Westernblot extrahierter Proteine mit den folgenden Extraktionspuffern: Spur 1/4 H₂O; Spur 2/5 0,01 M PBS; Spur 3/6 Boratpuffer. Probenverteilung: Spur 1-3 a Energieriegel Power Play, Spur 4-6a Sondenahrung; Spur 1-3 b TVP 2 % RR[®]-Soja, Spur 4-6 b TVP 100 % RR[®]-Soja.

Um mögliche Qualitätseinbußen und die Beschaffenheit der Proteinextrakte aus den unterschiedlichen Lebensmitteln (Tab. 18) zu beurteilen, wurden stellvertretend die

Ergebnisse

Extrakte der 5%igen RR[®]-Sojamehle, des Biskuits, des Soja-Schnitzels, des 2%igen Tofu, des Energieriegels und des 2%igen TVP in PAA-Gelen anfärbt (Abb. 53 a - f). Die mit der Abbildung 53 a - f korrespondierenden Proteingehalte zeigt Tabelle 19.

Wie die Abbildung 53 a und b zeigt, war die Extraktion der Gesamtproteine aus dem Sojamehl (a) und dem Biskuit (b) erfolgreich, und die Gele zeigen die für Soja typischen Bandenmuster (vgl. Abb. 17).

Tab. 19: Gesamtproteingehalte für die hergestellten Extrakte aus Bohnenrohmaterial mit und ohne gentechnischer Veränderung.

Abb. 53	Probe	Extraktionspuffer		
		H ₂ O	PBS	Borat
a	5 % Sojamehl, CRM	6,79	6,68	10,69
b	Biskuit	5,22	6,86	8,13
c	Tofu mit 2 % RR [®] -Soja	0,14	0,26	0,45
d	Energieriegel	12,13	14,34	11,88
e	Soja-Schnitzel	1,36	1,65	1,32
f	TVP 2 % RR [®] -Soja	1,78	1,88	2,53

Im Gegensatz dazu war eine Proteinextraktion aus dem Tofu (c) nur eingeschränkt möglich. Wie Abbildung 53 c zeigt, konnten nur geringe Menge an Proteinen mit MG von 20 und 35 kDa extrahiert werden, die den basischen und sauren Polypeptiden des Glycinins (Huang *et al.*, 1998) zuzurechnen waren. Dieses Ergebnis wird ebenfalls durch den geringen Proteingehalt (vgl. graue Felder Tab. 19) bestätigt. Der Extrakt des Energieriegels zeigt nur zwischen 20-30 kDa intensiv gefärbte Proteinbanden, die dem dem Energieriegel zugesetzten Milchcasein (Belitz und Grosch, 1992) entstammen. Banden dieses MG waren auch bei den anderen Proben, die zusätzlich Milchcasein enthielten, vorhanden (Ergebnisse nicht gezeigt).

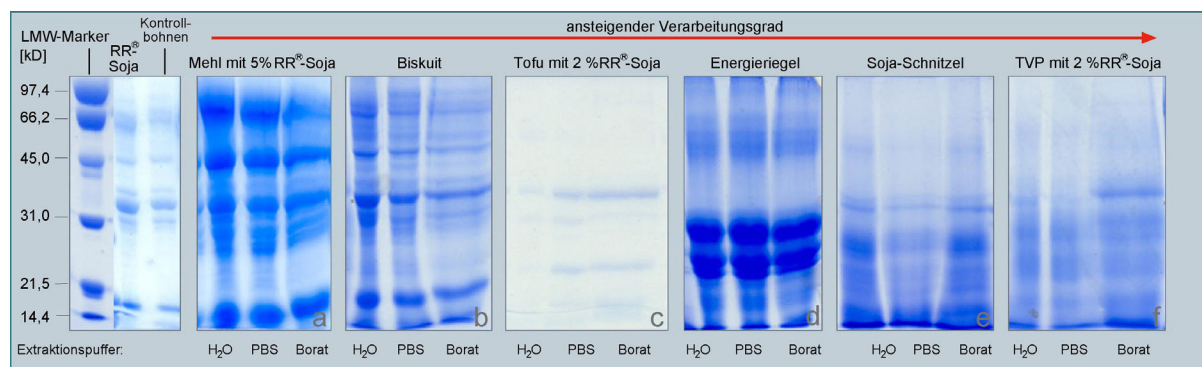


Abbildung 53 a - f: Anfärbung der unterschiedlich extrahierbaren Proteine mittels Coomassie. Die Verwendung der unterschiedlichen Extraktionspuffer ist unter den Blots gelistet. Spur 1/4/7/10/13/16 H₂O; Spur 2/5/8/11/14/17 0,01 M PBS; Spur 3/6/9/12/15/18 Boratpuffer. Probenverteilung Gel a: Spur 1-3 Sojamehl, CRM mit 5 % RR[®]-Soja, Gel b: Spur 4-6 Biskuit, mit RR[®]-Sojamehl, Gel c: Spur 7-9 Tofu mit 2 % RR[®]-Soja, Gel d: Spur 10-12 Energieriegel, Gel e: Spur 13-15 Soja-Schnitzel, Gel f: Spur 13-15 TVP mit 2 % RR[®]-Soja.

Im Sojaschnitzel (53 e) waren ebenfalls keine diskreten Banden intakter Proteine > 30 kDa mehr extrahierbar. Die mit den Abbildungen korrespondierenden Proteingehalte (Tab. 19) spiegeln die technologische Verarbeitung der Produkte wider. Je höher der Verarbeitungsgrad war, um so niedriger war der zugehörige Proteingehalt. Nur der hohe Proteingehalt des Energieriegels ist durch die Anwesenheit des Milchcasein zu erklären.

Der höchste Verarbeitungsgrad lag bei den texturierten Extrakten (TVP, Nr. 26 und 27) vor. Während bei den zuvor beschriebenen Extrakten, wenn auch mit abnehmender Tendenz, diskrete Proteinbanden nachweisbar waren, zeigt Abbildung 53 f nur noch schwach gefärbte, unscharfe Banden. Einzig bei der Verwendung des sog. Boratpuffers ist bei ca. 35 kDa eine diffuse Bande erkennbar.

Tab. 20: Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse der immunochemischen Untersuchung mittels Westernblot.

Nr.	Probe	bek. Gehalt an GVO (RR [®] -Soja)	Westernblot
1	Sojamehl; CRM	0 %	--
2	Sojamehl; CRM	0,1 %	(+)
3	Sojamehl; CRM	0,5 %	+
4	Sojamehl; CRM	1 %	+
5	Sojamehl; CRM	2 %	+
6	Sojamehl; CRM	5 %	++
7	Sojamehl	100 %	++
8	Tofu	0 %	--
9	Tofu	1 %	--
10	Tofu	2 %	--
11	Tofu	4 %	--
12	Tofu	100 %	--
13	Taco-Fertigmischung "Sobie"	k. A.	--
14	Sojaschnitzel	k. A.	--
15	Getränkepulver "Herbalife"	k. A.	--
16	Energieriegel "Powerplay"	k. A.	--
17	Diätiegel "Amaretto"	k. A.	--
18	Diätiegel "Rum"	k. A.	--
19	Braun Sondennahrung	k. A.	--
20	Sojawurst	k. A.	--
21	Ölsaatenmischung A	50 %	++
22	Ölsaatenmischung B	1 %	+
23	text. Soja 2 %	2 %	--
24	text. Soja 100 %	100 %	--
25	Biskuit	--	++
26	Sojagen	--	--
27	Almased	--	--
28	Slimfast	--	--

-- kein messbares Signal, (+) schwach pos. Signal, + pos. Signal, ++ stark pos. Signal.

Die Ergebnisse der gefärbten Proteinextrakte aus Abbildung 53 korrelierten eng mit den Nachweisen der CP4 EPSPS im Westernblot (Abb. 50-52). Wie Abbildung 53 zeigt, war die Extraktion und damit die Darstellung der Proteine nur bei einem geringen Verarbeitungsgrad der Produkte möglich. Mit ansteigendem Verarbeitungsgrad waren aus dem Untersuchungsgut keine Proteine > 35 kDa mehr extrahierbar. Tabelle 20 zeigt zur Übersicht die Untersuchungsergebnisse sämtlicher 28 Produkte im Westernblot, da die Abbildungen 50-53 stellvertretend für die einzelnen Produktgruppen und Prozessierungen waren. Konnte mittels Westernblot eine potentielle gentechnische Veränderung nicht nachgewiesen werden, stellte sich die Frage, ob die CP4 EPSPS aus dem Produkt nicht mehr extrahierbar war, oder ob keine gentechnische Veränderung vorlag. Zum Vergleich der Methoden und zur Beantwortung obiger Fragestellung wurden alle 28 Proben im Anschluss mittels PCR gemäß der Methode nach § 35 LMBG untersucht.

4.5.1.2 Nachweis der gentechnischen Veränderung gemäß Methode § 35 LMBG

Bei der Untersuchung gemäß der Methode der amtlichen Sammlung nach § 35 LMBG wurden die Proben, wie unter 2.3.2.1 beschrieben, behandelt. Die Amplifizierbarkeit der extrahierten DNA, sowie die Anwesenheit von Soja in der Probe wurde mit dem Primerpaar GM03/GM04 (Amplifikatgröße 118 Bp) kontrolliert (vgl. Abb. 53), das aus einem Bereich des Lektin-Gens stammt und speziesspezifisch für Sojabohnen (*Glycine max* L.) ist.

Der Nachweis für die gentechnische Veränderung erfolgte mit dem für das RR[®]-Soja konstruktsspezifischen Primerpaar p35s-f2/petu-r1. Diese Primer hybridisieren zwischen der 35S Promotorsequenz aus dem Blumenkohlmosaikvirus (CaMV) und der Chloroplasten Transit Peptid (CTP) Sequenz aus *Petunia hybrida* (vgl. 2.2.2.1). Mit diesem Primerpaar erhält man ein PCR-Produkt einer Größe von 172 Bp (vgl. Abb. 54). Nur wenn sowohl der Lektin-Nachweis als auch der RR[®]-Soja Nachweis positiv ausfällt, ist der Rückschluss zulässig, dass die Probe RR[®]-Soja enthält. Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch in Agarosegelen getrennt und mittels Längenstandards (100 Bp) auf die zu erwartenden Produktgrößen überprüft. Alle untersuchten Proben sind in der Reihenfolge ihrer Auftragung auf die Agarosegele in den Abbildungen 53 und 54 in Tabelle 21 gelistet.

Tab. 21: Probenverteilung der 28 in der PCR gemäß § 35 LMBG untersuchten Proben, aufgetragen in den Agarosegelen Abbildung 53 und 54.

Nr.	Probe	bek. Gehalt an RR [®] - Soja
1	H ₂ O	-
2	Positiv Kontrolle	1 %
3	Negativ Kontrolle	0 %
4	Sojamehl; CRM	0 %
5	Sojamehl; CRM	0,1 %
6	Sojamehl; CRM	0,5 %
7	Sojamehl; CRM	1 %
8	Sojamehl; CRM	2 %
9	Sojamehl; CRM	5 %
10	Sojamehl	100 %
11	Tofu	0 %
12	Tofu	1 %
13	Tofu	2 %
14	Tofu	4 %
15	Tofu	100 %
16	Taco-Fertigmischung "Sobie"	k. A.
17	Sojaschnitzel	k. A.
18	Getränkepulver "Herbalife"	k. A.
19	Energieriegel "Powerplay"	k. A.
20	Diätiegel "Rum"	k. A.
21	Diätiegel "Amaretto"	k. A.
22	Braun Sondennahrung	k. A.
23	Sojawurst	k. A.
24	Ölsaatenmischung A	50 %
25	Ölsaatenmischung B	1 %
26	text. Soja 2 %	2 %
27	text. Soja 100 %	100 %
28	Biskuit	--
29	Sojagen	--
30	Almased	--
31	Slimfast	--

k.A.: keine Angabe über den Gehalt an RR[®]-Soja bei vorhandenem Hinweis auf GVO im Zutatenverzeichnis; --: keine Kennzeichnung.

Zur Vermeidung falsch positiver sowie falsch negativer Ergebnisse wurden alle Proben jeweils Kontrollen aus Bohnenrohmaterial mit und ohne gentechnischer Veränderung in Spur zwei und drei gegenübergestellt. Aus allen 28 Proben wurden nach der Extraktion Amplifikate der erwarteten Produktgröße von 118 Bp (vgl. Abb. 54) erhalten. Damit war die Anwesenheit von Soja in allen untersuchten Proben sowie die Funktionalität der eingesetzten DNA in die PCR bestätigt.

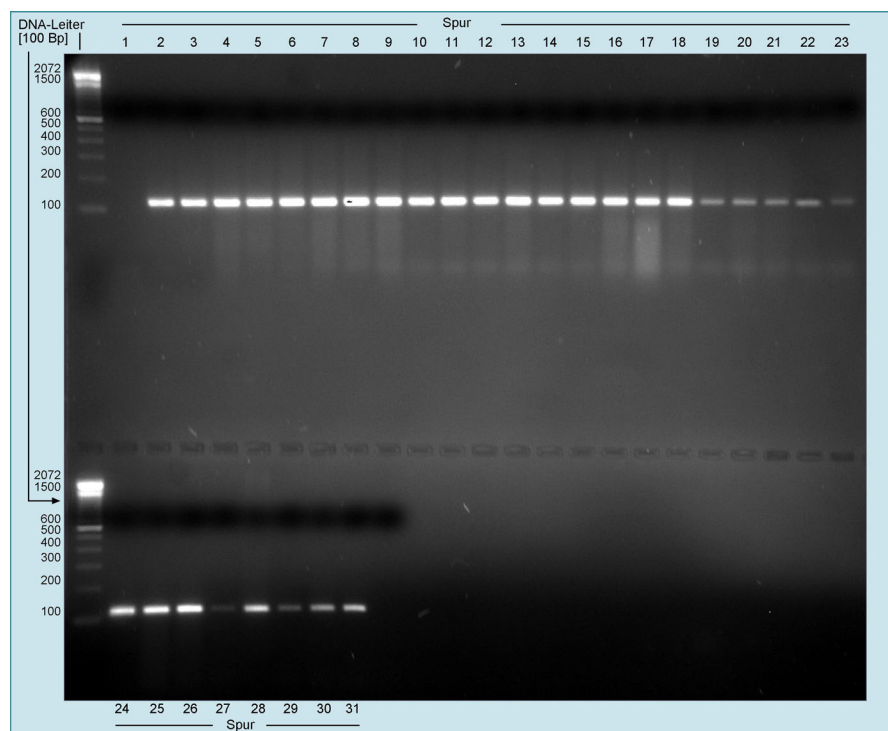


Abbildung 54: Agarosegel der untersuchten 28 Proben sowie Kontrollen und Wasserproben mit dem Primerpaar GM03/GM04 zur Überprüfung der Amplifizierbarkeit der extrahierten DNA und dem Nachweis, dass es sich um Soja-DNA handelt.

Abbildung 55 zeigt den spezifischen Nachweis der RR[®]-Sojabohnen in den 28 untersuchten Produkten. In allen Proben (vgl. Tab. 21) außer Nr. 4; 11; 23 und 29-31 konnte eine gentechnische Veränderung nachgewiesen werden. Bei den Proben Nr. 4 (Sojamehl) und Nr. 11 (Tofu) handelte es sich um im Labormaßstab angefertigte Modelllebensmittel, die einen Anteil von 0 % an GVO enthielten, was durch die Untersuchungsergebnisse bestätigt wurde.

Die Probe 23 war eine Wiener Wurst mit Sojaprotein anstelle des Fleischanteils. Auch diese Probe enthielt nach den Ergebnissen der qualitativen PCR kein RR[®]-Soja, obwohl im Zutatenverzeichnis der Probe auf gentechnisch verändertes Soja hingewiesen wurde! Da der Nachweis des Lektin-Gens in der PCR ebenfalls problemlos erfolgte, ist nicht von einem falsch negativen Ergebnis auszugehen.

Die Proben Nr. 29-31 waren Handelsproben, bei deren Herstellung sicher von der Verwendung von Sojabohnen auszugehen war, die entsprechend der Untersuchungsergebnisse nicht von gentechnisch veränderten Pflanzen stammten.

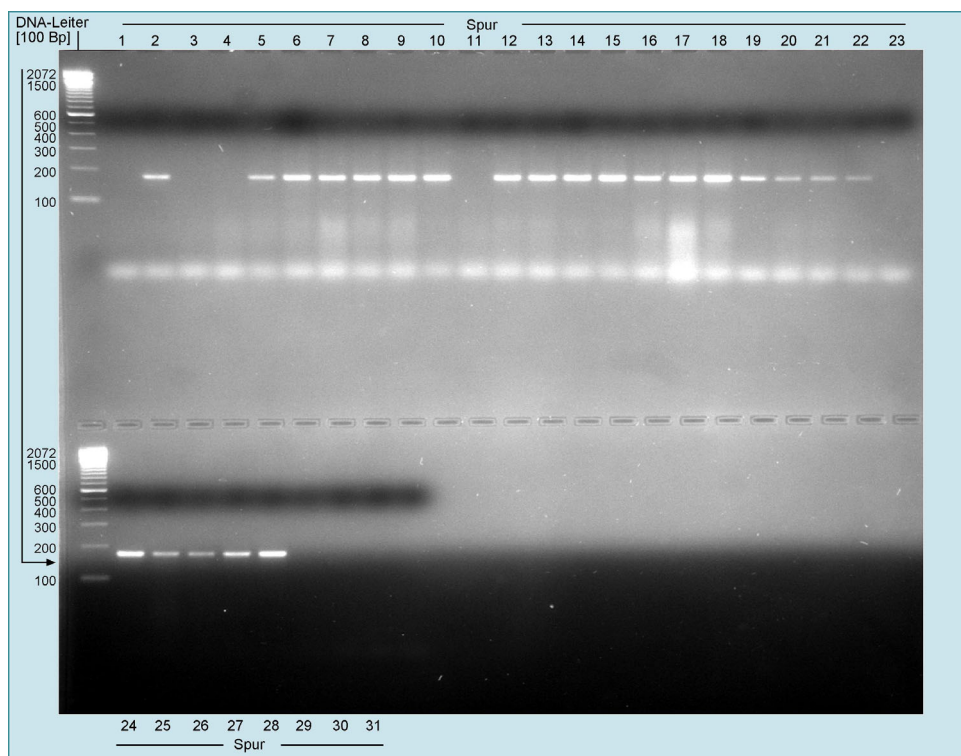


Abb. 55: Agarosegel der untersuchten 28 Proben sowie Kontrollen und Wasserproben zum spezifischen Nachweis der gentechnischen Veränderung mit dem Primerpaar p35s f-1/petu r1 und einem Amplifikat von 179 Bp.

Alle mit dem spezifischen Nachweissystems als RR[®]-Sojabohnen detektierten Proben lieferten auch zuvor beim Lektin Nachweis ein positives Ergebnis. Aus allen 28 Proben konnte in ausreichenden Mengen amplifizierbare Soja-DNA bereitgestellt werden. Mit beiden Primersystemen wurden unabhängig von der Beschaffenheit und dem Verarbeitungsgrad der Proben Amplifikate erhalten, wobei die Intensität der ausgebildeten Amplifikate Rückschlüsse auf die vorherige Prozessierung der Proben zuließen. Ein besonderes Extraktionssystem zur Behandlung lektinhaltiger Proben (Van Hoef *et al.*, 1998; Hurst *et al.*, 1999) musste nicht herangezogen werden.

Um auch eine quantitative Aussage über den Anteil an RR[®]-Soja machen zu können, wurden im Anschluss alle 28 Proben mittels Real-time PCR (TaqMan[™]-Verfahren) untersucht. Testsysteme, die Primer und Sonden in der benötigten Spezifität für dieses System enthalten, sind seit 2001 kommerziell verfügbar. Das hier angewandte Verfahren wurde in Anlehnung an das Ringversuchsprotokoll Tender XXIV/98/A3/001 (2001) durchgeführt. Die benötigten Primer und Sonden wurden durch die Fa. TIBMOLBIOL (Berlin) bezogen.

4.5.1.3 Nachweis der genetischen Veränderung in RR[®]-Sojabohnen mittels Real-time PCR nach der TaqMan[™] Methode

Die Quantifizierung des Anteils an RR[®]-Soja mittels Real-time PCR nach der TaqMan[™] Methode (vgl. 3.4.4.2) erfolgte mit dem Standardkurvenverfahren, nach dessen Auswertung, ausgehend vom Ct-Wert, die zunächst unbekannte Templatemenge im Untersuchungsgut berechnet werden kann. Mit dieser Methode ist es auch möglich zu beurteilen, ob das untersuchte Produkt die Vorgaben des mit der VO (EG) Nr. 49/2000 eingeführten Schwellenwertes von 1 % erfüllt, und ob eine Kennzeichnung ausgelöst wird. Voraussetzung für ein solches Nachweisverfahren ist zertifiziertes Referenzmaterial (CRM, siehe Tab. 1) zur Herstellung von Standardreihen, mit denen der Gehalt an RR[®]-Soja berechnet werden kann.

Die relative Quantifizierung wurde mit den beiden folgenden PCR-Systemen durchgeführt. Zum Nachweis des spezifischen Sequenzbereiches aus dem Lektin-Gen von Soja (Gesamtsojaanteil) wurde das Primerpaar GM1-F/GM1-R und die FAM-markierte Sonde GM1-S verwendet. Das Primerpaar RR1-F/RR1-R und die FAM-markierte Sonde RR1-S amplifizieren spezifisch die Sequenz aus der Übergangsregion zwischen der 35S Promotorsequenz des Blumenkohlmosaikvirus (CaMV) und der aus *Petunia hybrida* stammenden Transitpeptidsequenz (CTP) und wurden zum Nachweis der RR[®]-Soja DNA verwendet.

Die beiden benötigten Verdünnungsreihen mit Standards von 1:10 bis 1:2.000 (vgl. 3.4.4.2) wurden ausgehend von der Gesamt-DNA der 5%igen RR[®]-Sojamehle (CRM, Fluka) hergestellt. Zur Absicherung der Ergebnisse wurden alle Versuche jeweils als Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Ct-Werte für die Soja-Referenz-Standardreihe sollten lt. Ringversuchsprotokoll Tender XXIV/98/A3/001 (2001) im Bereich von 23-29 liegen, die der RR[®]-Soja Standardreihe bei 28-34. Um eine optimale Verdünnungsstufe der Proben-DNA zu verwenden, wurden zwei Ansätze mit den Verdünnungen 1:10 und 1:40 eingesetzt.

Die Berechnung der RR[®]-Sojaanteile erfolgte mittels Excel nach Auswertung der Rohdaten des ABI 7700. Die Einstellung des Threshold cycle (Wert oberhalb des Grundrauschens bei dem die PCR in die exponentielle Phase übergeht) wurde manuell durchgeführt. Hierzu dienen die sog. *Amplification Plots*, die die während der PCR aufgenommenen Reportersignale (ΔR_n) in Abhängigkeit von der Zyklenzahl wiedergeben. In Abbildung 56 a und b sind die *Amplification Plots* für die beiden

Ergebnisse

Aus dem Verhältnis der ermittelten Kopienzahlen wurde der relative Gehalt an RR[®]-Soja in Prozent berechnet. Die RR[®]-Sojaanteile der Proben 10-31 wurden nach dem gleichen Verfahren ermittelt. Die Ergebnisse sind zur Übersicht aller 28 Proben in Tabelle 22 zusammengefasst. Die Tabelle zeigt zum Vergleich die Ergebnisse, die mit allen anderen in dieser Arbeit eingesetzten Untersuchungsverfahren erzielt wurden.

Tab. 22: Übersicht über alle 28 mittels Real-time PCR untersuchten Proben und die über die Geradengleichung ermittelten Gehalte an RR[®]-Soja (Spalte grau unterlegt). Ebenfalls sind in der Tabelle die Ergebnisse aus den Kapiteln 4.5.1.1 – 4.5.1.2, die bei der Untersuchung der 28 verschiedenen Proben (s. auch Tab. 20) auf die Anwesenheit von RR[®]-Soja erzielt wurden, dargestellt.

Nr.	Probe	bekannter Gehalt an RR [®] -Soja	RR [®] -Soja-PCR TaqMan [™] -Prinzip	Westernblot	Soja-Lectin PCR	RR [®] -Soja-PCR
1	Sojamehl; CRM	0 %	0 %	--	+	--
2	Sojamehl; CRM	0,1 %	0,12 % ± 0,08 %	(+)	+	+
3	Sojamehl; CRM	0,5 %	0,36 % ± 0,24 %	+	+	+
4	Sojamehl; CRM	1 %	1,41 % ± 0,93 %	+	+	+
5	Sojamehl; CRM	2 %	2,16 % ± 1,4 %	+	+	+
6	Sojamehl; CRM	5 %	6,76 % ± 4,4 %	++	+	+
7	Sojamehl	100 %	127 % ± 83 %	++	+	+
8	Tofu	0 %	0 %	--	+	-
9	Tofu	1 %	1,73 % ± 1,2 %	--	+	+
10	Tofu	2 %	4,3 % ± 2,8 %	--	+	+
11	Tofu	4 %	5,26 % ± 3,5 %	--	+	+
12	Tofu	100 %	74,8 % ± 49 %	--	+	+
13	Taco-Fertigmischung "Sobie"	k. A.	3,5 % ± 2,3 %	--	+	+
14	Sojaschnitzel	k. A.	12,0 % ± 8 %	--	+	+
15	Getränkpulver "Herbalife"	k. A.	23,4 % ± 15 %	--	+	+
16	Energieriegel "Powerplay"	k. A.	3,4 % ± 2,2 %	--	+	+
17	Diätiegel "Amaretto"	k. A.	9,26 % ± 6 %	--	+	+
18	Diätiegel "Rum"	k. A.	12,0 % ± 8 %	--	+	+
19	Braun Sondernahrung	k. A.	11,0 % ± 7 %	--	+	+
20	Sojawurst	k. A.	0 %	--	+	--
21	Ölsaatenmischung A	50 %	68,0 % ± 44 %	++	+	+
22	Ölsaatenmischung B	1 %	0,3 % ± 0,20 %	+	+	+
23	text. Soja 2 %	2 %	2,5 % ± 1,6 %	--	+	+
24	text. Soja 100 %	100 %	82,0 % ± 54 %	--	+	+
25	Biskuit	k.K.	53,5 % ± 35 %	++	+	+
26	Sojagen	k.K.	0 %	--	+	--
27	Almased	k.K.	0 %	--	+	--
28	Slimfast	k.K.	0 %	--	+	--

-- kein messbares Signal, (+) schwach pos. Signal, + pos. Signal, ++ stark pos. Signal, k.A.: keine Angabe über den Gehalt an RR[®]-Soja bei vorhandenem Hinweis auf GVO im Zutatenverzeichnis. k.K.: keine Kennzeichnung.

* Die Berechnung der Standardabweichung erfolgt nach der Maßgabe der statistischen Auswertung des Ringversuches EU tender XXIV/98/A3/001 (s. Beschreibung nächste Seite).

Alle in Spalte 2 der Tabelle 22 dargestellten RR[®]-Soja Gehalte beziehen sich im prozentualen Verhältnis auf die Zutat Soja im Gesamterzeugnis. Die Ergebnisse der quantitativen PCR bestätigten die Ergebnisse der qualitativen Untersuchungen (Kapitel 4.5.1.2, Abb. 53 und 54) und lieferten zusätzlich Informationen über den Gehalt an RR[®]-Soja in den untersuchten Erzeugnissen. Bei allen Handelsproben außer Nr. 20 (Sojawurst) und Proben 26-28 wurde ein Gehalt an RR[®]-Soja $> 1 \%$ nachgewiesen, so dass die vorhandene Kennzeichnung der Proben erforderlich war. Durch den im Jahre 2000 im BgVV organisierten internationalen Ringversuch bestand die Möglichkeit, die ermittelten Daten der statistischen Auswertung auf die vorliegende Arbeit anzuwenden. Die Ergebnisse in Tabelle 22 sind mit einer Schwankungsbreite angegeben, die über die Vergleichsstandardabweichung der Ringversuchsergebnisse ermittelt wurde. Dazu wurde innerhalb des Ringversuchs in zertifiziertem Referenzmaterial und einem verarbeiteten Produkt für sechs verschiedene GVO-Gehalte (0,1 %, 0,5 %, 1 %, 2 %, 5 %; 2 % TVP) aus der ermittelten Vergleichsstandardabweichung der Vertrauensbereich ermittelt, in dem der tatsächlich ermittelte Wert mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % liegt. Der Mittelwert der Vergleichsstandardabweichung betrug bezogen auf alle sechs Materialien 66 %.

5. DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines immunologischen Nachweisverfahrens und der anschließende Vergleich mit vorhandenen DNA-analytischen Methoden zur Detektion von RR[®]-Soja. Besonderes Interesse lag in der Anwendung beider Methoden auf ein breites Spektrum unterschiedlicher Lebensmittel und Handelsproben mit verschiedenen Prozessierungsgraden. Durch validierte Nachweismethoden wird u.a. für den Verbraucher eine ausreichende Rechtssicherheit bei der Kennzeichnung von GVO in Lebensmitteln gewährleistet.

In der Verordnung (EG) Nr. 1139/98 wird zwischen dem Nachweis von gentechnisch veränderten Proteinen und gentechnisch veränderter DNA methodisch nicht unterschieden, so dass beide Verfahren als gleichwertig anzusehen sind. Die Kennzeichnung eines Lebensmittels wird gemäß Verordnung (EG) Nr. 49/2000 ausgelöst, sobald ein Schwellenwert von 1 % bei der unbeabsichtigten Verunreinigung mit gentechnisch veränderten Bestandteilen überschritten wird. Daher ist zur Beurteilung einer möglichen Kennzeichnungspflicht ein quantitativer Nachweis, der auf der direkten Quantifizierung oder auf dem Vergleich mit einer Standardsubstanz beruht, inzwischen unverzichtbar. Mit der im Jahr 2000 im Bereich der Lebensmittel eingeführten Methode der Real-time PCR steht mittlerweile auf DNA-analytischer Ebene ein solches Werkzeug zur Verfügung.

Bisher wurde noch kein direkter Vergleich der beiden möglichen Analysenverfahren (DNA/Protein) an Lebensmitteln unterschiedlicher Herkunft und verschiedener technologischer Prozessierung durchgeführt. Die vorliegende Arbeit sollte hierzu einen Beitrag leisten und sowohl Grenzen als auch Perspektiven der entwickelten Methode beleuchten.

5.1 Proteinextraktion

Zur Bereitstellung geeigneter Extrakte für den Immunoblot wurden insgesamt fünf verschiedene Puffersysteme variierend in der Zusammensetzung und Beschaffenheit erprobt. Ebenfalls wurden in der praktischen Anwendung die Temperatur und Zeit variiert. Die Entwicklung der Extraktionsmethode erfolgte zunächst an Bohnenrohmaterial mit und ohne Anteil an RR[®]-Soja. Der ermittelte Proteingehalt der gewonnenen Extrakte variierte bei dem zunächst verwendeten Extraktionsverhältnis von

Gewebe zu Puffer von 1:10 zwischen Gehalten von durchschnittlich = 6,5 - 11 mg/mL Gesamtprotein unabhängig der gewählten Parameter.

Bei der Variation von Temperatur und Dauer mit den unterschiedlichen Extraktionspuffern wurde keine Auswirkung auf die Ausprägung und Beschaffenheit der Banden festgestellt (vgl. 4.2.1.1). Ebenfalls konnte der Zusatz von Detergenzien und reduzierend wirkenden Agenzien keine Verbesserung bei der Detektion erzielen, sondern führte bei der zusätzlichen Verwendung von DTT und SDS im Extraktionspuffer zu einer unerwünschten Dissoziation der Banden in kleinere Untereinheiten im Westernblot. Der Vorteil eines solchen detergenz-haltigen Extraktionspuffers besteht darin, dass dieser auch unmittelbar als Probenpuffer in die Elektrophorese eingesetzt werden kann, so dass zusätzliche Arbeitsschritte entfallen. Eine besondere Eignung des verwendeten Tris-Tricine Puffers zur Extraktion niedermolekularer Proteine konnte nicht festgestellt werden. Klein *et al.* (1985) empfehlen diesen Puffer zur Anwendung bei Immundiffusionsuntersuchungen, bei denen allerdings die AG-AK Reaktion direkt im Gel stattfindet und ein Matrixwechsel daher entfällt.

Die optimalen Verhältnisse von Gewebe zu Puffer wurden mit 1:50 – 1:100 ermittelt (vgl. 4.2.1.3). Unter diesen Voraussetzungen wird im Hinblick auf die weitere Verwendung der Methode für zusammengesetzte Lebensmittel eine Überladung des PAA-Gels vermieden. Auch Rogan *et al.* (1992; 1999) hatten bei ihren Untersuchungen das optimale Verhältnis mit 1:50 ermittelt. Die optimale Gelbeladung mit einem Proteingehalt zwischen 5 - 12 µg/µL wurde in enger Relation mit den Extraktionsverhältnissen ermittelt.

Bei den ermittelten Parametern von 37 °C bei 30 min und einem Extraktionsverhältnis von 1:50 kann mit einer ausreichenden Extraktionseffizienz (Lipton *et al.*, 2000) für ein qualitatives Nachweissystem gerechnet werden, so dass diese Parameter als ausreichend zur Extraktion der löslichen Proteine aus dem Bohnenmaterial angesehen wurden.

Zur Feststellung von Nachweisgrenzen wurde teilweise von diesen Extraktionsverhältnissen abgewichen. Bei dieser Fragestellung wurde der Focus allerdings auf den kleinsten experimentell noch nachweisbaren RR[®]-Soja Anteil ohne eine Berücksichtigung möglicher Matrixeffekte gelegt. Bei einem Einsatz von Extraktionsverhältnissen > 1:40 würde es bei der Anwesenheit zusätzlicher Proteinquellen schnell zu einer Überladung des PAA-Gels und damit zu einer

Überlagerung der gesuchten Banden kommen. Durch die Anwendung des Testsystems auf zusammengesetzte Lebensmittel waren unterschiedliche Proteinquellen in der Matrix zu erwarten. Da z.B. Caseine, resultierend aus zugesetztem Milcheiweiß, sowie hydrolysierte Kollagene häufig in der Kombination mit Sojaproteinen in Aufbaunahrung Verwendung finden, sollte die Extraktion immer unter Berücksichtigung des Zutatenverzeichnisses bei den vorgeschlagenen Verhältnissen erfolgen.

Die in der zusammenfassenden Untersuchung (vgl. Abb. 21) eingesetzten lyophilisierten Extrakte zeigten gegenüber den frischen Extrakten eine deutliche Abnahme in ihren Reaktivitäten gegenüber dem polyklonalen Antiserum. Daher sollte von einer solchen Lagerstabilisierung abgesehen werden und die Extrakte möglichst frisch oder nach einer Lagerung bei + 4 °C bzw. – 20 °C in die Analysen eingesetzt werden. Besonders erwähnt werden soll auch die gute Extraktionsfähigkeit von H₂O unter den obigen Bedingungen. Alle erhaltenen Gele und Blots (vgl. 4.2) zeigten mit den anderen Puffern vergleichbare Ergebnissen und keine Qualitätseinbußen. Ein deutlicher Vorteil bei der Verwendung von H₂O ist dessen universelle Verfügbarkeit, da sämtliche Schritte der Reagenzienbeschaffung und Pufferherstellung entfallen können.

5.2 Klonierung der CP4 EPSPS

Nach der Sequenzierung (vgl. 4.3.3) lag die gesamte Sequenzinformation der RR[®]-Sojabohne in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Datenbankrecherche vor (vgl. 4.3.1) und die Expressionsklonierung der CP4 EPSPS wurde nach der Optimierung der PCR Bedingungen in *E. coli* durchgeführt.

Optimierung der PCR-Bedingungen

Bei der Optimierung der PCR Bedingungen zur Insertion der Restriktionsschnittstellen in die Zielsequenz konnte ein System entwickelt werden, mit dem eine hohe Ausbeute an Amplifikaten unter Berücksichtigung folgender Anforderungen erreicht wurde.

- Die Qualität eines PCR-Amplifikates wird sowohl durch die optimale Annealingtemperatur der Primer als auch durch die verwendete MgCl₂-Konzentration beeinflusst.
- Eine zu hohe Zyklenzahl und eine zu hohe Magnesiumkonzentration im Mastermix führen zu unspezifischen Amplifikaten und zum Mismatching der Primer bei der PCR (Newton und Graham, 1995).

Das Risiko des Einbaus von Fehlbasen ist ein Problem, insbesondere wenn das erhaltene Amplifikat in einem Expressionsvektor als Matrize für ein Protein dienen soll. Die Anzahl der Zyklen konnte unter der Verwendung des Expand 20 kb^{PLUS} PCR System (Fa. Roche) bei einer MgCl₂-Konzentration von 2,5 mM und einer Annealingtemperatur von 65 °C auf 30 beschränkt werden (vgl. Abb. 30).

Als weiteres Problem erwies sich die Qualität der DNA nach der Nucleinsäureextraktion (vgl. 4.3.2.1). Es ist wahrscheinlich, dass nach der CTAB-Aufreinigung noch pflanzliche Polyphenole (Rossen *et al.*, 1992; De Broer *et al.*, 1995) im DNA-Extrakt vorhanden waren, die als PCR-Inhibitoren gewirkt haben und die PCR vollständig inhibiert haben. Hier bestätigt sich die Aussage von Zimmermann *et al.* (1998), dass ein empfindlicher DNA-Nachweis eher mit wenig aber qualitativ hochwertiger als mit viel aber verunreinigter DNA zu verwirklichen ist. Nach der Nucleinsäure-Extraktion aus dem Bohnenmaterial mittels CTAB-Methode (vgl. 4.3.2.1) wurde ab sofort immer eine Säulenaufreinigung der DNA über ein Silika-Harz angeschlossen, so dass die restlichen, inhibitorischen Begleitstoffe entfernt wurden. Nach der Verwendung der Säulenaufreinigung und dem Einsatz der optimierten PCR-Bedingungen waren die Ergebnisse reproduzierbar.

Auswahl des Expressionssystems

Da die die Herbizidtoleranz vermittelnde CP4 EPSPS kommerziell nicht zur Verfügung stand, wurde die Bereitstellung der CP4 EPSPS als rekombinantes Protein in einem Überexpressionssystem in *E. coli* realisiert (vgl. 2.3.2.6). Ziel war die Immunisierung von Kaninchen. Deshalb musste die CP4 EPSPS in großer Menge und Reinheit hergestellt werden und eine hohe Immunogenität besitzen. Da dieser Teil der Arbeit bei der Fa. Genexpress (Berlin) durchgeführt wurde, konnte ein dort etabliertes System verwendet werden, das über eine Expression mittels Histidin als Fusionsprotein in *E. coli* abläuft. Fusionsproteine erfüllen die Anforderungen an Menge, Reinheit und Immunogenität und haben durch den Histidinanteil eine starke Affinität zu Nickelionen, die anschliessend zur Aufreinigung mittels Nickelchelatsäule (vgl. 4.4.3) ausgenutzt wurde. Ein Nachteil der Fusionsproteine liegt in dem zusätzlich zum rekombinanten Protein exprimierten, möglicherweise antigen wirkenden Fremdprotein. Hier war allerdings zu beachten, dass der Fusionsanteil mit fünf Histidinresten im Vergleich zur CP4 EPSPS sehr klein war. Durch die denaturierende Aufreinigung nach der Expression

wurde der Bildung von *inclusion bodies* ebenso wie einer verminderten Löslichkeit der CP4 EPSPS entgegengewirkt.

5.3 Validierung des Systems Westernblot

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei New Zealand White Kaninchen zur Bildung von Antikörpern gegen die CP4 EPSPS mit dem rekombinanten Protein immunisiert (vgl. 4.4.1).

Im Immunoblot konnte gezeigt werden, dass sowohl Reaktivitäten der Antiseren gegenüber dem Antigen (rek. CP4 EPSPS) als auch gegenüber den RR[®]-Sojabohnen bestanden, da von beiden Antiseren eine Bande im Bereich von 47 kDa (vgl. Abb. 36 und 37) detektiert wurde. Keine Aktivitäten zeigten sich mit den Präimmunseren der Kaninchen, so dass davon auszugehen war, dass keine vorherige Sensibilisierung der Kaninchen stattgefunden hatte. Beide Antiseren erkannten zusätzlich eine Bande im Bereich von 30 kDa sowohl bei den RR[®]-Sojabohnen als auch bei den Kontrollbohnen (vgl. 4.4.3). Die Bande bei Serum 2 ließ sich im Gegensatz zu Serum 1 durch den Zusatz von 5%igem Magermilchpulver zum Blockierungsreagenz entfernen (vgl. 4.4.5). Unter den reduzierenden Bedingungen der SDS-PAGE wurden Untereinheiten der rekombinanten CP4 EPSPS in Form von kleineren Banden ($MG < 47\text{kDa}$) ebenfalls erkannt, da diese ihre Bindungsfähigkeit gegenüber dem Antikörper nicht verloren hatten.

Affinitätschromatographische Reinigung der Antiseren

Bei dieser Art der Reinigung wurden die Immunglobuline aus den Antiseren spezifisch an die zuvor an eine Matrix immobilisierte CP4 EPSPS gekoppelt und erst nach Entfernung der übrigen Serumbestandteile mittels milder pH-Wert Absenkung eluiert. Sinn dieser reversiblen Antigen-Antikörper Bindung war, durch die Kopplung des Serums an das spezifische Antigen (vgl. 4.4.3) potentiell kreuzreagierende Komponenten zusammen mit den übrigen Bestandteilen des Serums zu entfernen. Zum Vergleich der Reinigungswirkung wurde bei einem Teil der Antiseren vor der Affinitätschromatographie eine Ammoniumsulfatfällung durchgeführt. Nach der Chromatographie wurden alle Seren im PAA-Gel getrennt (vgl. 4.4.3, Abb. 40). Die Entfernung des Albumins war bei allen Seren erfolgreich. Allerdings war kein Unterschied zwischen den beiden Reinigungsversionen zu erkennen. Die Entfernung kreuzreagierender Komponenten wurde durch die Spezifitätsuntersuchungen verfolgt.

Spezifität der Antiseren

Um die Spezifität der polyklonalen Antiseren und mögliche Kreuzreaktivitäten zu überprüfen, wurde der Focus der Untersuchungen in Kapitel 4.4.7 auf potentielle Aminosäuresequenzhomologien der *Leguminosae* und weiterer charakteristischer Lebensmittelbestandteile gelegt, die im Untersuchungsgut mit der Zielmatrix konkurrieren könnten. Besitzen zwei verschiedene Antigene eine gemeinsame Determinante, so dass ein Antikörper, der gegen Antigen A gerichtet, ist auch von Antigen B gebunden wird, handelt es sich um eine Kreuzreaktivität (Roitt *et al.*, 1987).

Insgesamt wurden 21 verschiedene Proteinextrakte auf mögliche Kreuzreaktivitäten gegenüber den beiden polyklonalen Antiseren untersucht. Beim Antiserum des Kaninchens Nr. 1 fanden Kreuzreaktivitäten gegenüber Soja, Erbsen, Kichererbsen, Paranüssen und Reis statt. Die Kreuzreaktivitäten gegenüber Soja fanden, wie zuvor beschrieben (vgl. 4.4.5), bei MG 30 kDa statt. Bei Erbsen fanden Bindungen im Bereich von 30 und 43 kDa statt. Beim Reis wurden Banden im Bereich von 40 und 45 kDa detektiert. Die schwachen Kreuzreaktionen gegenüber Kichererbsen und Paranüssen lagen in einem Bereich von 15 - 20 kDa. Nach dem Zusatz von 5%igem Magermilchpulver zum Blockierungsschritt ließen sich die Reaktionen außer gegenüber der Erbse unterbinden. Mit dem Antiserum von Kaninchen Nr. 2 wurden keine Kreuzreaktivitäten gegenüber den Proteinextrakten ermittelt.

Da die Erbse (*Pisum sativum*) und die Kichererbse (*Cicer arietinum* L.) ebenso wie die Sojabohne (*Glycine max*) zur Familie der Leguminosen gehören, verfügen sie über 11S und 7S Globuline (vgl. 4.1), die sie als Speicherproteine bei der Keimung mobilisieren. Betrachtet man deren Nukleinsäuresequenzen und die abgeleiteten Aminosäuren, bestehen insbesondere für die basischen β -Polypeptide des 11S Globulins von Soja, Erbse, Ackerbohne und Raps konservierte Bereiche (Helbling, 1987; Belitz und Grosch, 1992), während man im Bereich der sauren β -Polypeptide variable Regionen findet. Da zur Immunisierung die rekombinante CP4 EPSPS und nicht der Extrakt aus RR[®]-Soja verwendet wurde, bleibt die Frage nach dem Auslöser der starken Kreuzreaktionen insbesondere bei Antiserum 1 bestehen. Möglicherweise bestehen auch Aminosäuresequenzhomologien zwischen dem verwendeten Antigen und denen der Hauptspeicherproteine. Die gefundene Kreuzreaktivität bei der Überprüfung der

Reaktivitäten nach der Immunisierung gegenüber konventionellem Soja spricht ebenfalls für die obigen Befunde (vgl. 4.4.4).

Ein ähnliches immunologisches Verhalten von Leguminosen innerhalb ihrer Pflanzenfamilie wurde schon 1963 von Klotz und Turkov sowie Lambert und Yarwood (1991) beschrieben. In einer Studie von Robert (1985) beschreibt dieser auch Homologien zwischen der Glutelinfraktion von Reis und des Legumins der Erbse. Dies wurde durch die Ergebnisse in Bild 42 b (Spur 16) bestätigt. Hier fanden Kreuzreaktionen von Serum 1 mit den sauren β -Polypeptiden (MG 38 kDa) der 11S-Globuline von Erbse und der Legumin-ähnlichen Glutelinfraktion von Reis statt. Carter (1992) beschreibt Kreuzreaktivitäten speziell bei polyklonalen Antikörpern gegenüber Soja (11S- und 7S-Globuline), Erbse (11S- und 7S-Globuline), Paranuss (11S-Globuline), Sesam (11S-Globuline) und Kürbis (11S-Globuline).

Da eine Abtrennung kreuzreagierender Bestandteile bei Serum 1 mit der Affinitätschromatographie nicht erreicht werden konnte, wurde das Antiserum von Kaninchen Nr. 1 nicht für weitere Untersuchungen eingesetzt. Der hohe apparative Aufwand einer Affinitätschromatographie muss gegenüber einer alleinigen Ammoniumsulfatfällung überprüft werden, die auch zur Abtrennung des Serumalbumins ausreicht. Eine andere Möglichkeit mit geringerem Aufwand zur Entfernung von Kreuzreaktivitäten stellt die sog. Immunabsorption (Amersham Biosciences, 2002) dar. Hierbei wird das Antiserum gegenüber einem an eine Matrix (z.B. Sepharose) gebundenen potentiell kreuzreagierenden Proteinextrakt absorbiert und kreuzreagierende Proteine auf diese Weise entfernt. Eine solche Behandlung könnte für Antiserum Nr. 1 zumindest gegenüber konventioneller Soja und Erbse durchgeführt werden, um das Serum doch in einem Immunoassay als Nachweisantikörper zu verwenden.

Sensitivität

Der in dieser Arbeit entwickelte Immunoassay auf Westernblotbasis zum Nachweis gentechnisch veränderter RR[®]-Soja wurde nach der Entwicklung der Extraktionsmethode durch die Überprüfung der wichtigsten Assayparameter validiert. Hierbei handelt es sich um die optimale Verdünnung der Antiseren und die Festlegung von Nachweisgrenzen. Nach dem Ausschluss des kreuzreagierenden Antiserums von Kaninchen 1 (vgl. 4.4.5) zeigte der Assay eine sehr gute Spezifität. Falsch positive Reaktionen gegenüber anderen *Leguminosae* und weiteren häufig verwendeten

Lebensmittelzutaten konnten somit ausgeschlossen werden. Da der Westernblot im Gegensatz zum ELISA keine strikt quantitative Methode ist, erfolgte die Festlegung der Nachweisgrenze unter Verwendung von zertifizierten Referenzmaterialien im Vergleich von Banden mit bekannten Gehalten an RR[®]-Soja (vgl. 4.4.7).

Die Anforderungen an die Sensitivität eines Immunoassays definiert Stave (1999) über die folgende Annahme: Die Konzentration eines transgenen Proteins extrahiert aus Saatgut beträgt in 1 mL 6×10^{-8} M. Unter der Annahme eines Schwellenwertes von 1 % würde dies bedeuten, dass die Nachweisgrenze des Immunoassays mindestens 6×10^{-10} M betragen muss, um mit dem System eine verwertbare Aussage machen zu können. Da lt. Khalil (1991) die Nachweisgrenzen von Immunoassays im Bereich von 10^{-12} - 10^{-13} M liegen, würde diese Bedingung erfüllt. In einer Westernblot Untersuchung von Rogan *et al.* (1999) gelang der Nachweis von 100 pg gereinigtem CP4 EPSPS Protein. Ausgedrückt als nachweisbarer Anteil von RR[®]-Samen in der Mischung mit konventionellem Samen, betrug dieser 0,25 % und stieg für getoastetes Mehl bis zu einer Nachweisgrenze von 1 % an.

Die experimentelle Nachweisgrenze wurde für das hier entwickelte System unter Verwendung von zertifiziertem Referenzmaterial unter leicht veränderten Extraktionsbedingungen und mit erhöhter Gelbeladung (vgl. 4.4.7) mit 0,1 % RR[®]-Soja ermittelt. An dieser Stelle muss daraufhingewiesen werden, dass der Einsatz von Referenzmaterial nicht zur Simulation von zusammengesetzten Lebensmitteln benutzt werden kann. Im Hinblick auf die Anwendung des Testsystems zur Analyse von Lebensmitteln ist davon auszugehen, dass sich die Nachweisgrenze wegen unvermeidbarer Matrixeffekte verringert und selten erreicht werden kann.

5.4 Methodenvergleich

Ziel der Arbeit war die Entwicklung einer immunochemischen Nachweismethode, um diese im Anschluss mit der gemäß § 35 LMBG validierten DNA-analytischen Methode (L 23.01.22-1) an ausgewählten Lebensmitteln mit unterschiedlichen technologischen Herstellungsprozessen auf ihre Eignung zum Nachweis gentechnischer Veränderungen zu erproben. Durch den rapiden Fortschritt im Bereich der Entwicklung DNA-analytischer Nachweismethoden stand ab Mitte des Jahres 2000 auch ein System zur Quantifizierung von gentechnisch veränderten Anteilen in Lebensmitteln zur Verfügung. Im Anschluss an den Vergleich der beiden Methoden wurde auch dieses

Verfahren für den DNA-analytischen Nachweis in Lebensmitteln erprobt (Methode in Vorbereitung für die amtliche Sammlung gemäß § 35 LMBG).

Auswahl des Untersuchungsmaterials

Die Auswahl des Probenmaterials erfolgte vorrangig nach zwei Gesichtspunkten. Die Probe sollte eine sichere Quelle für Sojaprotein und/oder –DNA darstellen. Handelte es sich um kommerzielle Produkte, sollten die Proben über einen Hinweis auf eine gentechnische Veränderung gemäß VO (EG) 1139/98 als RR[®]-Soja-haltiges Produkt mit dem entsprechenden Wortlaut verfügen. Weiterhin sollten die Proben einen Querschnitt der üblichen technologischen Prozesse abbilden, die bei der Verarbeitung von Sojabohnen eingesetzt werden (vgl. 4.5.1, Tabelle 18).

Durch die Verwendung von zertifiziertem Referenzmaterial war es möglich, die Methoden an standardisiertem Material zu vergleichen. Leider ist dieses Material nur in Form von Sojamehlen mit definierten Gehalten an RR[®]-Soja und nicht für anderweitig verarbeitete Produkte erhältlich. Für den Bereich „dickgelegter“ Proteine wie z.B. Tofu wurde dieses als Modelllebensmittel mit unterschiedlichen Gehalten an RR[®]-Soja hergestellt. Ebenso standen neben Mischungen von Ölsaatenmehlen texturierte Sojaproteine zu Untersuchungszwecken zur Verfügung.

Alle anderen „Sojaverarbeitungsformen“, die eine Kennzeichnung als Hinweis einer gentechnischen Veränderung enthielten (vgl. Abb. 49), konnten gezielt käuflich erworben werden. Eine Ausnahme bildeten fermentierte Produkte und Sojaöle. Es war nicht möglich, diese beiden Produktformen mit entsprechenden Gehalten an RR[®]-Soja als Modelllebensmittel herzustellen, so dass über den Nachweis von Proteinen oder DNA innerhalb dieser Produktgruppen keine Aussage gemacht werden konnte. In raffinierten Pflanzenölen, z.B. hergestellt aus Soja (Greiner und Konietzny, 1997; Pietsch *et al.*, 1997), konnte bisher noch kein reproduzierbarer molekularbiologischer Nachweis einer gentechnischen Veränderung geführt werden, so dass bisher auch eine Kennzeichnung dieser Produkte entfällt. Hellebrand *et al.* (1998) sowie Pauli *et al.* (1998) gelang es, DNA aus Soja- bzw. Rapsöl zu extrahieren. Sie setzten allerdings entweder sehr große Ausgangsmengen zur Extraktion ein oder arbeiteten mit kaltgepresstem Öl.

Da Sojaprodukte entweder als Fleischersatz oder als pflanzlicher Proteinlieferant und in Form von Zusatzstoffen (z.B. Lecithin, E 322) Verwendung finden, wurde der Focus auf diese Produktpalette gelegt. Die Anwesenheit von Sojaproteinen in

Fleischprodukten basiert hauptsächlich auf deren funktionalen Eigenschaften, wie hohes Wasserbindungsvermögen, Fettbindungskapazitäten sowie Emulgatoreigenschaften (Rittenburg *et al.*, 1987; Meyer *et al.*, 1996) und war nicht Gegenstand der hier durchgeführten Untersuchung.

Westernblot vs. PCR

Um die bisher ermittelten Ergebnisse auf im Handel befindliche sojahaltige Produkte zu übertragen, wurden alle Proben auf die mögliche Anwesenheit von DNA oder Proteinen untersucht, die eine Toleranz gegenüber dem Herbizid Roundup® in Pflanzenmaterial vermitteln. Mit dem Westernblot konnten in 9 der 28 Proben veränderte Proteine nachgewiesen werden. Mit der PCR gemäß § 35 LMBG (L 23.01.22-1) gelang der spezifische Nachweis von RR®-Soja in 22 der 28 Proben. Bei der PCR erfolgt als Kontrolle der Amplifizierbarkeit auch ein Nachweis von Sojabestandteilen, der bei den 6 als RR®-Soja negativ getesteten Proben positiv ausfiel. Daher war davon auszugehen, dass bei diesen Proben unter Berücksichtigung der Nachweisgrenze der Methode (vgl. S. 115/116) keine gentechnische Veränderung vorlag. Bei näherer Betrachtung der mittels Westernblot als RR®-Soja positiv ermittelten Proben fällt auf, dass diese entweder durchweg aus Bohnenrohmaterial oder aus nicht weiter verarbeitetem Sojamehl bestanden oder dieses als Proteinquelle enthielten (vgl. Tab. 18, Probe Nr. 10). Bei den übrigen Proben, bei denen übliche technologische Prozesse der Lebensmittelherstellung Anwendung fanden sowie mit steigendem Verarbeitungsgrad des Untersuchungsmaterials, ließ sich im Gegensatz zur PCR keine gentechnische Veränderung nachweisen.

Eine gelelektrophoretische Trennung mit anschließender Anfärbung der Extrakte der verschiedenen Verarbeitungsprodukte (Tabelle 19) sowie die zugehörigen Proteingehalte sollten zur Klärung beitragen. Nach Belitz und Grosch (1992) hängt die Löslichkeit von Proteinen stark vom Grad der Denaturierung ab und betrifft somit besonders Methoden, deren Nachweis auf extrahierbaren Proteinen beruht. Wie die Gelfärbung (vgl. Abb. 53) deutlich zeigte, konnten mit steigendem Verarbeitungsgrad des Sojaproteins kontinuierlich weniger Proteine extrahiert und im PAA-Gel sichtbar gemacht werden. Bei den immunochemischen Untersuchungen konnte folglich kein Protein mehr zur Reaktion mit dem Antikörper gebracht werden.

Bei Tofuprodukten ist ein weiterer Punkt zu beachten. Da bei dessen Herstellung traditionell Sulfate wie z.B. Calciumsulfat eingesetzt werden, kommt es gemäß

Hettiarachchy und Kalapathy (1997) zu einer so starken Abnahme der Löslichkeit der Proteine, dass diese anschließend nicht mehr extrahiert werden können. Dies ließ sich mit dem getrennten und angefärbten Extrakt im PAA-Gel (Abb. 53) bestätigen, da die Darstellung diskreter Proteinbanden nicht mehr gelang. Vielmehr gelang es nur in Teilen, ausreichend Proteine aus den verarbeiteten Produkten für die Nachweise zur Verfügung zu stellen. Der rapide Löslichkeitsverlust der Sojaproteine bei ansteigendem Verarbeitungsgrad führte dazu, dass die Proteine so stark degeneriert waren, dass sie mit den etablierten Bedingungen nicht mehr ausreichend extrahiert werden konnten.

Die hier vorgestellten Ergebnisse machen deutlich, dass die proteinchemischen Methoden nicht durch Inhibierungen oder ablaufende Konkurrenzreaktionen im klassischen Sinn beeinträchtigt wurden. Bei der industriellen Gewinnung von Sojaproteinen finden Temperatur, Feuchte, Zeit, und Druck Anwendung, um die gewünschte Sojafraktion für die Lebensmittelproduktion zu gewinnen. Während dieser Prozesse können große Teile der biologischen Aktivität und der Löslichkeit des Sojaproteins eingebüßt werden (Liu, 1997), so dass die Sojaproteine durch diese Matrixeffekte anschließend für eine Extraktion nicht mehr zur Verfügung stehen.

Ein weiterer Punkt ist die Verfügbarkeit der zur Reaktion stehenden Epitope im Untersuchungsgut. Während Sequenzepitope in der Aminosäuresequenz eines Proteins zu finden sind, werden Konformationsepitope durch die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine ausgebildet. Kommt es durch äußere Einflüsse wie z.B. der Änderung des pH-Wertes oder der Salzkonzentration oder einer Temperaturerhöhung zur Denaturierung der Proteine, stehen diese Epitope für AG-AK Reaktionen nicht mehr zur Verfügung. Kommt ein Löslichkeitsabfall des Proteins hinzu, lässt sich auch unter extremen Extraktionsbedingungen, wie der Anwendung von Guanidinhydrochlorid (Rogan *et al.*, 1999), keine Resolubilisierung des Proteins erreichen, und die Extraktionseffizienz sinkt unter 30 %. Unter solchen Bedingungen sind Proteine für die Anwendung in immunochemischen Methoden nicht mehr verfügbar.

Betrachtet man beide eingesetzten Untersuchungsverfahren bzgl. ihrer Gesamtaussage und nicht hinsichtlich ihres Anwendungsspektrums, gelang es mit beiden Techniken, eine ausreichend sichere Ja/Nein Aussage bzgl. einer Anwesenheit potentieller GVO zu treffen.

Ein offensichtlicher Unterschied der DNA-Analytik gegenüber der immunologischen Analytik wird deutlich, wenn der Prozessierungsgrad der Lebensmittel mit in die

Betrachtungen einbezogen wird. Die bisher beschriebenen Probleme des Proteinnachweises in verarbeiteten Produkten treffen auch für den hier entwickelten Westernblot zu. Es war nicht mehr möglich, aus den stärker prozessierten Lebensmitteln ausreichende Mengen an Proteinen zu extrahieren und diese im Anschluss nachzuweisen. Im Gegensatz dazu konnte DNA aus allen Proben extrahiert und nachfolgend in den DNA-analytischen Untersuchungsverfahren eingesetzt werden.

Da zum momentanen Zeitpunkt hauptsächlich Sojaprodukte in verarbeiteter Form auf dem Lebensmittelsektor zu finden sind, ist sowohl eine Aussage über diese Produkte als auch nach Einführung des Schwellenwertes von 1 % eine Quantifizierung des Anteils an GVO gefordert. Nach den hier vorgestellten Ergebnissen kann die immunochemische Methode diese Anforderungen nicht erfüllen.

Vergleich mit bestehenden immunologischen Testsystemen

Die Literatur beschreibt verschiedene Methoden zum Nachweis der CP4 EPSPS, die entweder als ELISA-Methode oder Westernblot Anwendung finden (Lipp *et al.*, 2000; Stave *et al.*, 1999; Van Duijn *et al.*, 1999; Rogan *et al.*, 1999). Die von Stave *et al.* (1999) entwickelte ELISA-Methode zeigte bei der qualitativen Analyse in einem Ringversuch in europäischen Laboratorien (Lipp *et al.*, 2000) eine 1%ige Nachweisgrenze. Die Validierung wurde ausschließlich mit zertifiziertem Referenzmaterial durchgeführt und gibt keine Auskunft über die Möglichkeit eines Nachweises von RR[®]-Soja in aktuell verwendeten Lebensmittelzutaten. Dieser ELISA wurde kommerzialisiert und kann ausschließlich zur Quantifizierung von RR[®]-Soja in Rohmaterialien und Bohnenmehlen eingesetzt werden. Diese Materialien sind dem Testkit als Standardmehle beigelegt.

Ein ebenfalls kommerzielles System ist der Westernblot der Fa. TNO (Niederlande), der als Auftragsanalyse angeboten wird und in der Lage ist, noch 1 % CP4 EPSPS in nicht getoasteten Sojamehlen nachzuweisen (Van Duijn *et al.*, 1999). Rogan *et al.* (1999) zeigten in Ihrer Arbeit sowohl ein ELISA-System als auch einen Westernblot zum Nachweis der CP4 EPSPS. Beide Systeme sind in der Lage bis 2 % RR[®]-Soja in verschiedenen sojamehlhaltigen Matrices nachzuweisen. Sie beschreiben die Löslichkeit des Proteins bei der Extraktion als „Flaschenhals“ des Nachweisverfahrens, das verbesserungswürdig ist. Seit dem Jahr 2000 ist der sog. *Lateral Flow Test* oder auch *Dip Stick Test* kommerziell erhältlich, der als Schnelltest zum Nachweis der CP4 EPSPS in Raps, Baumwolle und Soja (Stave und Durandetta, 2000) in sog. *field*

conditions eingesetzt werden kann. Er besitzt eine Nachweisempfindlichkeit, die von 2 % bis zu 0,5 % reicht, ausgehend von der Kapazität des jeweiligen Untersuchungsgutes. Das vornehmliche Anwendungsgebiet der *Dip Stick Tests* sind die sog. *commodities*, in denen auch Soja gehandelt wird.

Das in dieser Arbeit entwickelte Testsystem kann, verglichen mit den kommerziellen Systemen, ebenfalls ausschließlich zum Nachweis wenig prozessierter Lebensmittel eingesetzt werden und erreicht mit seiner Nachweisgrenze von < 0,5 % das Niveau der *Dip Stick Tests*.

PCR gemäß Methode L 23.01.22-1 (§ 35 LMBG)

Wie oben beschrieben (vgl. 4.5.1.2), konnte mit der Methode L 23.01.22-1 in 22 der 28 Proben mit der PCR eine gentechnische Veränderung durch den Nachweis des artifiziellen Überganges vom CaMV35S-Promotor in das Chloroplasten Transit Peptid nachgewiesen werden. Das Ergebnis der qualitativen PCR ist wie beim Immunoblot zunächst eine Ja/Nein Antwort (Schreiber, 1999). Aus allen Proben erfolgte die DNA Extraktion gemäß CTAB-Methode, und es wurde nicht zwischen stark oder weniger stark verarbeiteten Produkten unterschieden, wie dies bei Hagen und Beneke (2000), Hurst *et al.* (1999) und Van Hoef *et al.* (1998) der Fall ist. Allerdings konnten bei der Visualisierung der Amplifikationsprodukte in Abb. 54 und 55 Unterschiede in der Amplifikatausbeute beobachtet werden. Bei den stärker prozessierten Produkten (Nr. 19-23, 27 und 29) wurden mit beiden Primersystemen geringere Amplifikatmengen erhalten. In allen Proben konnte über das Lektin-Gen Soja als Lebensmittelbestandteil nachgewiesen werden, so dass bei den Lebensmitteln keine Inhibition durch Matrixeffekte vorlag. Da bei der PCR im Gegensatz zum Immunoassay kleinste Mengen an DNA ausreichend sind, um diese bis zu 10^{12} Produkten zu vervielfältigen, sind die DNA-analytischen Verfahren im Vergleich mit den Immunoassays bei weitem weniger vom Verarbeitungsgrad der Produkte abhängig. Wird bei der Auswahl der Primer ein entsprechend kleines Amplifikat gewählt, können trotz einer möglichen Degradation der DNA während der Lebensmittelproduktion die Bruchstücke ausreichen, um die gewählten Primer zu hybridisieren.

Das DNA-analytische Verfahren erreicht durch den Nachweis der verschiedenen Genabschnitte, die nur für ein bestimmtes „Event“ (z.B. RR[®]-Soja) codieren, das so in der Natur nicht vorkommt (artifizuell), eine höhere Spezifität. Bei dem gezeigten immunochemischen Verfahren wird ein zusätzlich von der Pflanze exprimiertes Protein

detektiert und es kann nicht zwischen einer natürlich vorkommenden und der gentechnisch veränderten EPSPS unterschieden werden.

Die Methode L 23.01.22-1 liegt inzwischen unter der Nummer EN ISO 21569 (2002) als Norm-Entwurf zur Aufnahme in die Europäischen Normen vor. Die Nachweisgrenze der Methode wurde innerhalb dieses Verfahrens in einem internationalen Ringversuch mit 0,1 % RR[®]-Soja in zertifiziertem Referenzmaterial bestimmt.

Real-time PCR (TaqMan[™] Prinzip)

Bei der abschließenden Untersuchung mittels Real-time PCR (TaqMan[™] Assay) konnten für alle 28 untersuchten Produkte Gehalte an RR[®]-Soja ermittelt werden. Die Werte lagen zwischen 0 % und 127 %. Damit wurde die Kennzeichnungspflicht aller Handelsproben bestätigt. Eine Ausnahme bildet das Tofu-Würstchen, bei dem kein RR[®]-Soja nachgewiesen werden konnte. Ebenfalls gelang es mit dieser Nachweismethode, noch Gehalte von 0,1 % RR[®]-Soja in zertifiziertem Referenzmaterial ohne weitere Matrixeffekte nachzuweisen. Da alle Proben mit je zwei Replika gemessen wurden, wurde über die Vergleichsstandardabweichung des Ringversuches aus dem Jahr 2000 die individuelle Schwankungsbreite der Messwerte ermittelt. Durch die Hinzunahme des Wertes für TVP in die Berechnung der Vergleichsstandardabweichung ergab sich der hohe Mittelwert von 66 %. Dieser Wert wurde hinzugenommen, da ein Großteil der untersuchten Materialien ebenfalls in verarbeiteter Form vorlagen und nicht mit den Werten für die Referenzmaterialien alleine in Bezug gesetzt werden sollten.

Eine Aussage über die Richtigkeit der Messwerte kann nur im Vergleich gegenüber dem eingesetztem zertifizierten Referenzmaterial gemacht werden. Hierbei wird das Maß der Übereinstimmung zwischen dem ermittelten und dem als richtig angesehen Wert betrachtet. Eine solche Aussage kann nur für die Proben 1-6 und mit Einschränkung für die Proben 7-12 sowie 23 und 24 gemacht werden. Die Proben mit geringeren Gehalten an RR[®]-Soja zeigten eine bessere Übereinstimmung mit den erwarteten Werten. Auffällig ist hier, dass bei der Sojamehlprobe mit einem Gehalt von 100% RR[®]-Soja ein Wert von 127 % ermittelt wurde und bei den verarbeiteten Produkten wie Tofu (74 %) und TVP (82 %) deutlich geringere Werte ermittelt wurden (vgl. Tab. 22).

Ein Problem ist hierbei die Tatsache, dass zertifiziertes Referenzmaterial (CRM) zur Erstellung der Standardreihe nur bis zu einem Gehalt von 5 % RR[®]-Soja erhältlich ist,

so dass bei einem Anteil $> 5\%$ RR[®]-Soja im Untersuchungsgut immer eine Unsicherheit bei der genauen Ermittlung des Messwertes besteht (Moos-Nüssli, 2001). Mit der Real-time PCR läßt sich auch eine Aussage hinsichtlich des momentan gültigen Schwellenwertes von 1% machen, so dass sich diese Methode auch zur Überprüfung der Einhaltung gesetzlicher Vorschriften eignet. Weitere Vorteile dieser Methode liegen in der Verfügbarkeit der Ergebnisse innerhalb kürzester Zeit sowie in der Vermeidung von Carry-over Kontaminationen, ein Problem, dass häufig bei der Anwendung der PCR auftritt. Schritte wie z.B. die nachfolgende Gelelektrophorese können bei der Real-time PCR entfallen.

Nicht übersehen werden sollte der Aspekt, dass alle PCR Anwendungen und insbesondere die Real-time PCR durch den Einsatz sowohl der Chemikalien als auch der Geräte selbst im Vergleich zu den immunochemischen Methoden sehr kostenintensiv sind. Wegen der benötigten Laborumgebung ist das Verfahren für eine Aussage ähnlich einem Schnelltest (*field conditions*) nicht geeignet.

Da zu Beginn der Arbeit der heutige Grenzwert in der EU noch diskutiert wurde, erfolgte die Ausrichtung der Arbeit auf den Methodenvergleich und die qualitative Aussage beider Testsysteme. Seit Einführung des Schwellenwertes von 1% mit der Verordnung (EG) 49/2000 muss bei dessen Überschreitung eine Kennzeichnung erfolgen. Ausreichend validierte Systeme werden zur Lebensmittelüberwachung benötigt. Da die Methode der Real-time PCR kurz vor ihrer Aufnahme in die Sammlung gemäß § 35 LMBG steht, würde mit dieser Methode ein entsprechendes Werkzeug zur Verfügung stehen, das auch heute schon eine breite Anwendung in den Untersuchungsämtern findet (Pietsch und Waiblinger, 2000; Beneke *et al.*, 2001; Busch *et al.*, 2001; Waiblinger *et al.*, 2001).

5.5 Einsatzmöglichkeiten des Testsystems

Aus den im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelten Untersuchungsergebnissen lassen sich für die Methoden unterschiedliche Einsatzfelder ableiten. Eine grundsätzliche Unterscheidung muss zwischen einem quantitativen Nachweis und der sog. Schwellenwert- (*Threshold*-) Methode (Stave *et al.*, 1999) zum Nachweis der gentechnischen Veränderung getroffen werden.

Für einen quantitativen Nachweis muss die Methode bzgl. der Sensitivität, der Spezifität, der Präzision und Richtigkeit, sowie gegenüber Matrixeffekten und Extraktionseffizienzen validiert und ausreichend stabil sein. Stehen all diese

Informationen bereit, kann der gesuchte Gehalt an GVO gegenüber einem definierten Standard ermittelt werden.

Soll das Testsystem nach der Interpretation der Ergebnisse zu einer Ja/Nein Entscheidung über das Vorliegen einer gentechnischen Veränderung beitragen und auch eine Aussage bzgl. der Überschreitung eines definierten Schwellenwertes (*Threshold-Methode*) machen, muss das Assaydesign Vergleiche gegenüber zertifiziertem Referenzmaterial beinhalten. Wichtig hierbei ist, dass die Methode eine ausreichende Sensitivität besitzt, um eindeutig zwischen der Negativkontrolle und dem geforderten Schwellenwert unterscheiden zu können. Daher muss zunächst die Nachweisgrenze der Methode bestimmt und vom Schwellenwert getrennt betrachtet werden.

Mit den bisher beschriebenen Validierungsdaten des Westernblot wurde gezeigt, dass das Testsystem spezifisch und ausreichend empfindlich ist, um neu exprimierte Proteine in nicht verarbeiteten Lebensmitteln in Form von Ja/Nein Antworten nachzuweisen. Da der Westernblot ebenfalls als semiquantitative Methode den Anforderungen des gesetzlich geforderten Schwellenwertes zum Nachweis gentechnisch veränderter Organismen genügt, liegt mit der entwickelten Methode auch ein Werkzeug zur Überprüfung der Einhaltung des zur Zeit gültigen Schwellenwertes in Rohmaterialien vor. Bei Verwendung der Methode muss allerdings berücksichtigt werden, dass sie nicht gleichermaßen für jede Lebensmittelmatrix geeignet ist. Die Lebensmittelmatrix und damit verbunden die optimale Extraktionsmethode der Proteine stellt den wichtigsten Einflussfaktor des Systems dar und beeinflusst dessen Ausrichtung.

Künftige gesetzliche Regelungen

Mit Inkrafttreten der neuen Freisetzung- Richtlinie (2001/18/EG) sowie der positiven Bescheide des Europäischen Parlaments hinsichtlich der konkreten Gesetzesvorschläge der EU-Kommission ist ein wichtiger Schritt in Richtung Ende des Neuzulassungsstopps gentechnisch veränderter Pflanzen gemacht worden. Mit den vorgeschlagenen Verordnungen KOM(2001)425 und KOM(2001)182 soll die Zulassung und Kennzeichnung gentechnisch veränderter Lebens- und Futtermittel neu geregelt werden. Die zukünftige Regelung im konventionellen Bereich sieht ein gemeinsames Gesetz für Lebens- und Futtermittel vor, das sich auf die Verwendung gentechnisch veränderter Organismen und nicht auf die Neuartigkeit der Produkte bezieht. Die bisherige Vorgehensweise zur Überprüfung einer Kennzeichnungspflicht

durch den Nachweis des GVO im Endprodukt wird auf den gesamten Herstellungsprozess ausgeweitet. Bei der Kennzeichnung wird das derzeit gültige Nachweisprinzip zugunsten einer Rückverfolgbarkeit von GVO im Verlauf des Herstellungsprozesses im Produkt aufgegeben. Nicht mehr der Nachweis eines GVO im Endprodukt löst eine Kennzeichnung aus, sondern jede GVO-Anwendung, wobei es für die Kennzeichnung keine Rolle spielt, ob der jeweilige GVO im Lebensmittel charakteristische Spuren hinterlassen hat oder nicht. Eine derart umfassende Kennzeichnung ist nur möglich, wenn geeignete Systeme zur Rückverfolgbarkeit und eine lückenlose, warenstrombegleitende Dokumentation (*downstream production process*) vorhanden sind (transgen, 2003).

Um in Zukunft eine warenstrombegleitende Dokumentation zu ermöglichen, muss die Analytik auf potentielle GVO möglicherweise schon vor die Verarbeitung der Rohwaren verlagert werden. An dieser Stelle sei nochmals auf die gute Eignung immunochemischer Testverfahren in Form von *Dip Stick* Schnelltests hingewiesen, wie sie schon jetzt bei der Warenflusskontrolle von Soja aus Übersee vor dem Transport in die Überseehäfen *ARAG*¹ (Wenk *et al.*, 2001) Anwendung finden. Da die *Dip Sticks* eine ausreichende Nachweisempfindlichkeit $< 1 \%$ besitzen, werden diese Systeme zur Orientierung vor einer PCR verwendet um festzustellen, ob eine Schiffsladung GVO-Ware enthält und entsprechend gekennzeichnet werden muss. Dieses Beispiel zeigt durchaus Anwendungsfelder für immunologische Testverfahren, da die gesuchten Proteine mit einfachsten Methoden, wie z.B. einer Wasserextraktion, aus der Ware extrahiert werden und ein Ergebnis nach ca. 10-15 min vorliegt.

Auch das in dieser Arbeit entwickelte Testsystem genügt sämtlichen Anforderungen und ist ebenfalls in der Lage, eine Aussage über die Überschreitung eines Schwellenwertes zu machen, so dass durch die Änderung des Assayformates eine Verwendung möglich wäre. Allerdings schlagen Brett *et al.* (1999) bei *Dip Stick* Systemen für das Nachweissystem monoklonale Antikörper vor, da diese reproduzierbar in Qualität und Menge herzustellen sind.

Resümee

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass mit dieser Arbeit eine immunochemische Nachweismethode entwickelt wurde, mit der noch ein sicherer

¹ Amsterdam, Rotterdam, Antwerpen, Gent

Nachweis von 0,5 % RR[®]-Soja in zertifiziertem Referenzmaterial und nicht verarbeiteten Sojaprodukten gelang.

Allerdings kann diese Methode, wie andere bereits existierende immunochemische Methoden, nur für die Analyse nicht prozessierter Lebensmittel Anwendung finden. Durch die bei der Lebensmittelproduktion auftretenden Matrixeffekte wird die Löslichkeit und damit die Extrahierbarkeit der Proteine so stark reduziert, dass eine nachfolgende Extraktion nicht mehr ausreichend erfolgreich ist. Dem Vergleich mit der PCR konnte der Westernblot unter dem Gesichtspunkt der breiten Anwendungsmöglichkeiten bei prozessierten Proben nicht standhalten.

Unter dem Gesichtspunkt einer Rohwarenendkontrolle, wie sie möglicherweise durch die kommende Gesetzgebung nötig wird, sind immunologische Untersuchungsverfahren eine ernst zunehmende Alternative, da sie je nach Testformat ortsunabhängig und ohne hohen apparativen Aufwand und in kürzester Zeit angewendet werden können.

6. LITERATUR

Amersham Biosciences (2002). Affinity Chromatography Handbook: Principles and methods. Amersham Biosciences AB Uppsala, Sweden, 15-18.
<http://www.amershambiosciences.com>.

Agbios (2002). <http://www.agbios.com/dbase.php>.

Ahmed, F.E. (2002). Detection of genetically modified organisms in foods. Trends in biotechnology, Vol 20, No. 5, 215-223.

Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG. Methode L.23.01.22-1 (März 1998), Verfahren zur Probenahme und Untersuchung von Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und Bedarfsgegenständen. Loseblattsammlung, Berlin, Köln: Beuth Verlag GmbH.

Ansorge, W., Sproat, B., Stegemann, J., Schwager, C., & Zenke, M. (1987). Automated DNA Sequencing: Ultrasensitive Detection of Fluorescent Bands During Electrophoresis. Nucleic Acids Res. 15: 4593–4602.

Barry, G., Kishore, G., Padgett, S., Taylor, M., Kolacz, K., Weldon, M., Re, D., Eichholtz, D., Fincher, K., Hallas, L. (1992). Inhibitors of Amino Acid Biosynthesis: Strategies for imparting Glyphosate tolerance to Crop plants.

Belitz, H.D., Grosch, W. (1992). Lehrbuch der Lebensmittelchemie. 4. überarb. Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.

Beneke, B., Hagen, M., Thiele, M., Laube, S. (2001). Molekularbiologischer Nachweis transgener Pflanzenbestandteile in Futter- und Lebensmitteln: Möglichkeiten einer qualitativen und quantitativen Analyse. Archiv für Lebensmittelhygiene, 52, 108-111.

Bornkamm, R. (1990). Die Pflanze. Eine Einführung in die Botanik. 3. überarb. Auflage. Stuttgart, Ulmer.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. Anal. Biochem, 72, 248-254.

Brandt, P. (1995). „Transgene Pflanzen: Herstellung, Anwendung, Risiken und Richtlinien“. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland, ISBN 3-7643-5202-7.

Brett, G.M., Chambers, S.J., Huang, L., Morgan, M.R.A. (1999). Design and Development of immunoassays for detection of proteins. Food control, 10, 401-406.

Broll, H., Wagner, U., Spiegelberg, A., Zagon, J., Schauzu, M. (1998). Anwendung von Methoden zum Nachweis von gentechnisch veränderten Sojabohnen und gentechnisch verändertem Mais in im Handel befindlichen Lebensmitteln. Bundesgesundheitsblatt, 41 Jahrg., 12, 560-562.

- Busch, U., Mühlbauer, B., Böhm, U., Lieb, B. (2001).** Gentechnisch veränderter Mais und Soja – qualitativer und quantitativer Nachweis in Lebensmitteln. Dtsch. Lebensm. Rundschau, 97, 4, 125-129.
- Cardullo, R.A., Agrawal, S., Flores, C., Zamecnik, P.C., Wolf, D.E. (1988).** Detection of nucleic acids hybridisation by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8790-8794.
- Carter, J.M., Lee, H.A., Mills EN., C., Lambert, N., Chan, W.S., H., Morgan M., R.A. (1992).** Characterisation of Polyclonal and Monoclonal Antibodies against Glycinin (11 S Storage Protein) from Soya (*Glycine max*).
- Candrian U. (1994).** Die Polymerase-Kettenreaktion in der Lebensmittelanalytik. Mitt. Gebiete Lebensm. Hygiene **85**, 704-718.
- Connell, C., Fung, S., Heiner, C., Bridgham, J., Chakerian, V., Heron, E., Jones, B., Menchen, S., Mordan, W., Raff, M., Recknor, M., Smith, L., Springer, J., Woo, S. and Hunkapiller, M. (1987).** Automated DNA sequence analysis. Biotechniques, 5, (4), 342-348.
- Cooper A.J.L, Plum F. (1987).** Biochemistry and physiology of brain ammonia. Physiol Rev **67**: 440- 519.
- Davis, B.J. (1964).** Disk elektrophoresis II. Method and application to human serum Proteins. Ann. N.Y: Acad. Scien. **121**, 404.
- De Broer, S.H., Ward, L.J., Li, X., Chittaranjan, S. (1995).** Attenuation of PCR inhibition in the presence of plant compounds by addition of BLOTTO. Nucl Acids Res, 23, 2567-2586.
- della Cioppa, G., Bauer, C.S., Taylor, M.L., Rochster, D.E., Klein, B.K., Shah, D.M., Fraley, R.T., Kishore, G.M. (1987).** Targeting a herbicide-resistant enzyme from Escherichia coli to chloroplasts of higher plants. Biotechnology, 5, 579-584.
- Dower W. J., Miller J. F., & Ragsdale C. W. (1988).** High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation. Nucleic Acids Res. **16**: 6127-6145.
- Entscheidung 2001/25/EG** vom 27. Dezember 2000. Entscheidung der Kommission zur Untersagung der Verwendung bestimmter tierischer Nebenerzeugnisse in Tierfutter.
- Gassen H.G., Schrimpf, G. (Hrsg., 1999).** Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor. 2.Auflage. Spektrum Verlag Berlin, Heidelberg.
- Golovkin, M.V., Abrahám, M., Mórcocz, S., Bottka, S., Fehér, A., Dudits, D. (1993).** Production of transgenic maize plants by direct DNA uptake into embryogenic protoplasts. Plant Science, 90, 41-52.

- Greiner, R., Konietzny U. (1997).** Bietet die PCR-Analyse die Möglichkeit verarbeitete Lebensmittel als mit Hilfe der Gentechnik hergestellt zu identifizieren? In Schreiber, G.A., K.W. Bögl (eds.) Mit Hilfe gentechnischer Verfahren hergestellte Lebensmittel – 2- Statusbericht. BgVV-Heft 5, Berlin-Dahlem, 121-123.
- Hagen M., Beneke, B. (2000).** Nachweisbarkeit der gentechnischen Veränderung von Soja (Roundup ReadyTM Soja) in weiterverarbeiteten Produkten. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 113, 454-458.
- Hancock, K., Tsang, V.C.W. (1983).** India Ink staining of Proteins on nitrocellulose paper. Anal. Biochem. 133, 157-162.
- Hardegger, M., Brodmann, P., Herrmann, A. (1999).** Quantitative detection of the 35 S promoter and the NOS terminator using quantitative competitive PCR. Eur. Food Res. Technol. 209: 83-87.
- Helbling, D., Manteuffel, R. (1987).** Antigenic Homologies within the Vicilin-like and Legumin-like Classes of Storage Proteins as Studied by „Western Blot“ Analysis. Biochemie und Physiologie der Pflanzen 182, 223-231.
- Hellebrand, M., Nagy, M., Mörsel, J.Th. (1998).** Determination of DNA traces in Rapeseed Oil. Z. Lebensm. Unters. Forsch. A, 206, 237-242.
- Hemmer, W. (1997).** Foods Derived from Genetically Modified Organisms and Detection Methods. BATS-Reports, ISSN 1420-228X.
- Hemmer W., Pauli, U. (1998).** Labelling of food products derived from genetically engineered crops. A survey on detection methods. European Food Law Rev. 1/98, 27-38.
- Hettiarachchy, N., Kalapathy, U. (1997).** Soybean Protein Products. In Liu, K.S. Soybeans, Chemistry, Technology and Utilization. London: Chapman & Hall Chapter 8, 379-411.
- Hochuli, E., Döbeli, H., Schacher, A. (1987).** New metal chelat adsorbant selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. J Chromatography, 411, 177-184.
- Holtzhauer, M. (1995).** Biochemische Labormethoden. 2. überarbeitete Auflage, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York.
- Hübner, P., Studer, E., Lüthy, J. (1999).** Quantitative competitive PCR for the detection of genetically modified organisms in food. Food Control 10, 353-358.
- Hübner, P., Waiblinger, H.U., Pietsch, K., Brodmann, P. (2001).** Validation of PCR Methods for Quantification of Genetically Modified Plants in Food. Journal of AOAC International, 84, No. 6, 1855-1864.

- Hu, B., Esen, A. (1981).** Heterogeneity of Soybean Seed Proteins: One-Dimensional Electrophoretic Profiles of Six Different Solubility Fractions. *J. Agric.Food Chem*, **29**, 497-501.
- Huang, L., Mills, E.N.C., Carter, J.M., Morgan, M.R.A. (1998).** Analysis of thermal stability of soya globulins using monoclonal antibodies.
- Hurst, C.D., Knight, A., Bruce, I.J. (1999).** PCR detection of genetically soya and maize in foodstuffs. *Molecular breeding*, **5**, 579-586.
- Hymowitz, T. (1970).** On the domestication of the soybean. *Econ. Bot.* **24**, 408-421.
- James, C. (2002).** Global review of Commercialized Transgenic Croops 2002: ISAAA Briefs No. 27-2002. International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications. <http://www.isaaa.org>.
- Jongedijk, E., de Schutter, A.A.J.M., Stolte, T., van den Elzen, P.J.M., Cornelissen, B.J.C. (1992).** Increased resistance to potato virus X and preservation of cultivar properties in transgenic potato under field conditions. *Bio/Technology*, **10**, 422-429.
- Karlsson, P. (1988).** Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. 13. neubearb. Aufl.-Stuttgart, New York, Thieme Verlag.
- Kessler, H.G. (1988).** Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik-Molkereitechnologie.
- Khalil, O.S. (1991).** Photophysics of heterogenous immunoassays. In J.E. Butler, *Immunochemistry of solid-phase immunoassay*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Khyse-Andersen, J. (1984).** Elektrophoretic transfer of multiple gels: A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Meth.*, **10**, 203.
- Kishore, G., Shah, D. (1988).** Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. *Annu. Rev. Biochem.* **57**, 627-663.
- Klein, E., Baudner, S., Günther, H.O. (1985).** Immunchemische Bestimmung des Haselnußproteins mit Hilfe der Elektroimmundiffusion nach Laurell-I. Mitteilung der optimierten Methode. *Z Lebensm Unters Forsch*, **180**, 30-35.
- Kloz, J., Turkova, V. (1963).** Legumin, Vicilin and Proteins Similar to them in the Seeds of some Species of the *Viciaceae* Family (a comparative Serological Study). *Biologica Plantarum (Praha)*. **5** (1), 29-40.
- Köhler, G., Milstein, C. (1975).** Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity. *Nature*, **256**, 495-497.
- Köppel, E., Stadler, M., Lüthy, J., Hübner, P. (1997).** Sensitive Nachweismethode für die gentechnisch veränderte Sojabohne „Roundup Ready™“. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* **88**, 164-175.

KOM(2001)425 endgültig, 2001/0173 (COD). Vorschlag für eine Verordnung des Europäischen Parlamentes und des Rates über genetisch veränderte Lebens- und Futtermittel. (von der Kommission vorgelegt).

KOM(2001)182 endg.- 2001/180(COD). Vorschlag für eine Verordnung des Europäischen Parlamentes und des Rates über die Rückverfolgbarkeit und Kennzeichnung genetisch veränderter Organismen und über die Rückverfolgbarkeit von aus genetisch veränderten Organismen hergestelltem Lebensmitteln und Futtermitteln sowie zur Änderung der Richtlinie 2001/18/EG (2001/C 304 E/22).

Kull, U. (1993). Grundriß der allgemeinen Botanik. Stuttgart, New York: G. Fischer.

Lambert, N., Yarwood, J.N. (1991). Engineering Legume Seed Storage Proteins. Chapter 7, 167-187.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.

Leary, J.J., Brigati, D.J., Ward, D.C. (1983). Rapid and sensitive colorimetric method for visualizing biotin-labeled DNA-probes hybridized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose: Bio blots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 4045-4049.

Lee, L.G., Connel, C.R., Woo, S.L., Cheng, R.D., McArdle, B.F., Fuller, C.W., Halloran, N.D., Wilson, R.K. (1992). DNA sequencing with dye-labeled terminators and T7 DNA polymerase: effects of dyes and dNTPs on incorporation of dye-terminators and probability analysis of termination fragments", *Nucl. Acids Res.* **20**, 2471-2483.

Lin, H. Y, Chiang, J.W., Shih, D.YC. (2001). Detection of genetically Modified Soybeans by PCR Method and Immunoassay Kits. *Journal of Food and Drug Analysis*, Vol. 9, No.3 160-166.

Liu, K.S. (1997). Soybean protein products. In *Soybeans, Cemistry, Technology and Utilization* (pp 377 –407). London: Chapman & Hall.

Lipp, M., Anklam, E., Brodmann, P., Pietsch, K., Pauwels, J. (1999a). Results of an interlabotatory assessment of a screening method of genetically modified organisms in soy beans and maize. *Food Control*, 10, 379-383.

Lipp, M., Brodmann, P., Pietsch, K., Pauwels, J., Anklam, E. (1999b). IUPAC colloaborative trial study of a method to detect genetically modified soybeans and maize in dried powder. *J. AOAC Int.*, **82**, 923-928.

Lipp, M., Anklam, E., Stave, J.W. (2000). Validation of an Immunoassay for Detection and Quantification of a Genetically Modified Soybean in Food and Food Fractions Using Reference Materials: Interlaboratory Study. *Journal of AOAC International*, Vol. **83**, No. 4, 919-927.

- Lipton, C.R., Dautlick, J.X., Grothaus, G.D., Hunst, P.L., Magin, K.M., Mihaliak, C.A., Rubio, F.M., Stave, J.W. (2000).** Guidelines for the Validation an Use of Immunoassays for Determination of Introduced Proteins in Biotechnology Enhanced Crops and Derived Food Ingredients. *Food and Agricultural Immunology*, **12**, 153-164.
- Liver, K.J., Flood, S.J.A., Marmaro, J., Giustu, W., Deetz, K. (1995).** Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *Nat. Biotechnol.*, **14**, 303-308.
- Longstaff, M., Edmonds, H.S., Newell, C.A. (1995).** An improved method for the detection and quantification of recombinant protein in transgenic plants. *Plant Mol. Biol. Reporter*, **13**, 363-368.
- Lowe, C.R., Dean, P.D.G. (1974)** The principles of affinity chromatography, in: *Affinity Chromatography*, Wiley and Sons, London, 12-89.
- Lorenz, W. (1998).** Real-Time PCR-Quantifizierung von Nucleinsäuren. *BIOforum* 21, 586-588.
- Menz, M. (2001).** Weiterhin stabile Preis für Mischfutter? Jahresbericht der ZMP (Zentrale Markt und Preis-Berichtsstelle für Erzeugnisse der Land-, Forst- und Ernährungswirtschaft GmbH). ZMP-Zentralbericht. <http://www.zmp.de>.
- Meyer, A.H., (1998).** Kennzeichnung der Verarbeitungsprodukte gentechnisch veränderter Lebensmittel. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, Jahrg. 94., Heft 9, 321-325.
- Meyer, R., Chadonnens, F., Hübner, P., Lüthy, J. (1996).** Polymerase chain reaction (PCR) in the quality and safety assurance of food: detection of soya in processed meat products. *Z Lebensm Unders Forsch*, 203, 339-344.
- Meyer, R. (1999a).** Nachweis gentechnisch veränderter Lebensmittel. In *Gen-Welten Ernährung*. Hrsg. Esther V. Schärer-Züblin. Museum der Ernährung, Foundation Alimentarium Nestlé.
- Meyer, R. (1999b).** Development and application of DNA analytical methods for the detection of GMOs in food. *Food control*, 10, 391-399.
- Middendorf, L.R., Bruce, J.C., Bruce, R.C., Eckles, R.D., Grone, D.L., Roemer, S.C., Sloniker, G.D., Steffens, D.L., Sutter, S.C., Brumbaugh, J.A. and Patonay, G. (1992).** Continuous, on-line DNA sequencing using a versatile infrared scanner/electrophoresis apparatus. *Electrophoresis* **13**: 487-494.
- Moos-Nüssli E. (2001).** Gentests sind heikle Analysen. LID-Meidiendienst. Nr. 2522 vom 22.03.2001. <http://www.lid.ch/archiv/mediendienst/2001/md2508/seite2.htm>.
- Mülhardt, C. (1999).** *Der Experimentator: Molekularbiologie*. 1. Aufl. Stuttgart; Jena; Lübeck; Ulm; G. Fischer.
- Müller (1997).** *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **45**: 28-31.

Newton, C.R., Graham, A. (1995). PCR; 2. Auflage Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg.

OECD (2000). Consensus Document on the Biology of *Glycine max* (L.) Merr. (Soybean). OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No. **15**. <http://www1.oecd.org/ehs/ehsmono/Soybean.htm>.

Oil World (2001). <http://www.oil-world.com>

Ornstein, L. (1964). Disc electrophoresis I. Background and theory, Ann. N.Y. Acad. Scien., **121**, 404.

Padgett, S.R., Kolacz, K.H., Delanny, X., Re, D.B., LaVallee, B.J., Tinius, C.N., Rhodes, W.K., Otero, Y.I., Barry, G.F., Eichholz, D.A., Peschke, V.M., Nida, D.L., Taylor, N.B., Kishore, G.M. (1995). Development, identification and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. Crop Science, **35**, 1451-1461.

Pauwels, J., Kramer, G.N., Schimmel, H., Anklam, E., Lipp, M., Brodmann, P. (1999). EUR 18863/EN, Commercialization of Reference Materials and Methods & Scientific Liaison, Institute for Reference Materials and Measurements, Retieseweg, B-2440 Geel, Belgium, <http://www.irmm.jrc.be/rm/cert-reports.html>.

PE Biosystems (1999): Quantification of DNA/RNA using Real-Time PCR Detection.

Pietsch, K., Waiblinger, H.U., Brodmann, P. und Wurz, A. (1997a). Screeningverfahren zur Identifizierung gentechnisch veränderter pflanzlicher Lebensmittel. Dtsch. Lebensm. Rundschau **93**, 35-38.

Pietsch, K., Waiblinger, H.U., Brodmann, P., Wurz, A. (1997b). Screeningverfahren zum Nachweis „gentechnisch veränderter“ Lebensmittel pflanzlicher Herkunft. In Schreiber, G.A., K.W. Bögl (eds.) Mit Hilfe gentechnischer Verfahren hergestellte Lebensmittel – 2- Statusbericht. BgVV-Heft 5, Berlin-Dahlem.

Pietsch, K., Waiblinger, H.U. (2000). Bestimmung von Roundup Ready Soja mit dem LightCycler. Lebensmittelchemie, **54**, 73.

prEN ISO 21569:2002. Verfahren zum Nachweis von genetisch modifizierten Organismen und ihren Produkten. Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V. Ref. Nr. E DIN EN ISO 21569:2002-12.

Prober, J.M., Trainor, G.L., Dam, R.J., Hobbs, F.W., Robertson C.W., Zagursky, R.J., Cocuzza, A.J., Jensen, M.A., Baumeister, K. (1987). A system for rapid DNA Sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. Science **238**, 336-341.

QIAGEN (1998). The QIAGEN Guide to template Purification and DNA Sequencing (2nd Edition).

Richtlinie des Rates vom 23. April 1990 über die absichtliche Freisetzung genetisch veränderter Organismen in die Umwelt (90/220EWG), Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaft **L 117/15**, 8.5.1990.

Richtlinie 2001/18/EG des Europäischen Parlamentes und des Rates vom 12. März 2001 über die absichtliche Freisetzung genetisch veränderter Organismen in die Umwelt und zur Aufhebung der Richtlinie 90/220/EWG des Rates Abl. Vom 17. April 2001, Nr. L 106 S. 1.

Ringversuchsprotokoll (2000). Report on the EU tender XXIV/98/A3/001. Development of qualitative detection methods to identify a genetic modification in soybean and maize products.

Rogan, G.L., Ream, J.E., Berberich, S.A., Fuchs, R.L. (1992). Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Quantification of Neomycin Phosphotransferase II in Genetically Modified Cotton Tissue Extracts. *J. Agric Food Chem*, **40**, 1453-1458.

Rogan, G.J., Dudin, Y.A., Lee, T.C., Magin, K.M., Astwood, J.D., Bhakta, N.S., Leach, J.N., Sanders, P.R., Fuchs, R.L. (1999). Immunodiagnostic methods for detection of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in Roundup Ready[®] soybeans. *Food Control* **10**, 407-414.

Rossen L., Nørskov, P., Holmstrøm, K., O.F. (1992). Inhibition of PCR by components of food sample, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *Int J Food Microbiol*, **17**, 37-45.

Roitt, J.M., Brostorf J., Male D.K. (1991). Kurzes Lehrbuch der Immunologie. 2. neubearbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York.

Robert, L.S., Nozzolillo, C., Altosaar, I. (1985). Homology between legumin-like polypeptides from cereals and pea. *Biochem J*. **226**, 847-852.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977). DNA-sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5453-5467.

Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Ehrlich, H.A., Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction sites analysis for diagnosis of sickle cell anaemia. *Science* **230**, 1350-1354.

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G.T.; Mullis, K.B., Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA-polymerase. *Science* **239**, 487-491.

Schauzu, M. (1996). Sicherheitsbewertung von Lebensmitteln, die mit Hilfe genetisch veränderter Organismen hergestellt werden. BgVV/RKI, Gentechnik, Sonderheft, BGBl. 12/1996, S. 21-26, S.23.

Schauzu, M., Broll, H. (1998). Nachweis gentechnischer Veränderungen in Lebensmitteln. *Bioforum*, **21**, 494-498.

- Schauzu, M., Pöting, A., Sachse, K. (1998).** Lebensmittel und Gentechnik. BgVV-Informationsschrift. Hrsg. BgVV-Pressestelle. ISBN 3-931675-35-1.
- Schauzu, M. (1999).** Lebensmittel aus transgenen Pflanzen und gesundheitlicher Verbraucherschutz. *umwelt, medizin, gesellschaft*, 4/99.
- Schreiber, G.A. (1999).** Challenges for methods to detect genetically modified DNA in foods. *Food control*, 10, 351-352.
- Shah, D., Horsch, R., Klee, H., Kishore, G., Winter, J., Tumer, N., Hironaka, C., Sanders, P., Gasser, C., Aykent, S., Siegel, N., Rogers, S., Frayley, R. (1986).** Engineering herbicidetolerance in transgenic plants. *Science* **233**, 478-481.
- Smith, L.M., Sanders, J.Z., Kaiser, R.J., Hughes, P., Dodd, C., Connel C.R., Heiner, C., Kent, S.B.H., Hood, L.E. (1986).** Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* **321**, 674-679.
- Stadler, M., Hübner, P. (1998).** Probleme bei der Anwendung der 35S- und NOS-PCR für die GVO-Analytik. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* 89, 308-317.
- Stave J.W. (1999).** Detection of new modified proteins in novel foods derived from GMO-future needs. *Food control*, 10, 367-374.
- Stave, J.W., Durandetta, D. (2000).** GM Crop testing Grows Amid Controversy. *Today's chemist at work*, Volume 9.
- Steinrucken, H.C., Amrhein, N. (1980).** The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimic acid-3-phosphate synthase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **94**, 1207-1212.
- Steinrucken, H.C., Amrhein, N. (1984).** 5-Enolpyruvylshikimic acid-3-phosphate synthase of *Klebsiella pneumoniae*. 2. Inhibition by glyphosate [N-(phosphonomethyl)glycine] *Eur. J.Biochem*, **143**, 351-357.
- Transgen (2002/2003).** <http://www.transgen.de>.
- Vätilingnom, M., Pijnenburg, H., Gendre, F., Brignon, P. (1999).** Real-Time Quantitative PCR Detection of Genetically Modified Maximizer Maize and Roundup Ready Soybean in Some Representative Foods. *Journal of Agricultural & Food chemistry*, 47, 12, 5261-5266.
- Van Duijn, G., Van Biert, R., Bleeker-Marceli, H., Peppelman, H., Hessing, M. (1999).** Detection methods for genetically modified crops. *Food control* 10, 375-378.
- Van Hoef, A.M.A., Kok, E.J., Bouw, E., Kuiper, H.A., Keijer, J. (1998).** Development and application of a selective detection method for genetically modified soy and soy derived products. *Food Additives and Contaminants*, Vol. 15, No. 7, 767-774.

Van Sommeren, A.P.G, Machielsen P.A.G.M, Gribnau T.C.J. (1993). Comparison of three activated agaroses for use in affinity chromatography: effects on coupling performance and ligand leakage, *J Chromatogr*, **639**, 23-31.

Verordnung (EWG) Nr. 2092/91 des Rates vom 24. Juni 1991 über den ökologischen Landbau und die entsprechende Kennzeichnung der landwirtschaftlichen Erzeugnisse und Lebensmittel (ABl. Nr. L 198 vom 22.07.1991, S. 1) Fortgeschriebene, nicht amtliche Fassung, Stand: Februar 2003.

Verordnung (EG) 258/97 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 27. Januar 1997 über neuartige Lebensmittel und neuartige Lebensmittelzutaten, Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften **Nr. L 43**, 1-7, 14.2.1997.

Verordnung (EG) 1139/98 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 26. Mai 1998 über Angaben, die zusätzlich zu den in der Richtlinie 79/112/EWG aufgeführten Angaben bei der Etikettierung bestimmter aus genetisch veränderten Organismen hergestellter Lebensmittel vorgeschrieben sind, Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften **Nr. L 159**, 4-7, 3.6.1998.

Verordnung (EG) 49/2000 der Kommission vom 10. Januar 2000 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1139/98 des Rates über Angaben, die zusätzlich zu den in der Richtlinie 79/112/EWG aufgeführten Angaben bei der Etikettierung bestimmter aus genetisch veränderten Organismen hergestellter Lebensmittel vorgeschrieben sind.

Verordnung (EG) 50/2000 der Kommission vom 10. Januar 2000 über die Etikettierung von Lebensmitteln und Lebensmittelzutaten, die genetisch veränderte oder aus genetisch veränderten Organismen hergestellte Zusatzstoffe und Aromen enthalten.

Vodkin, L.O., Rhodes, P. R., Goldberg, R.B. (1983). cA lectin gene insertion has the structural features of a transposable element. *Cell*, **34**, 1023-1031.

Waiblinger, H.U., Gutmann, M., Hädrich, J., Pietsch, K. (2001). Validierung der Real-time PCR zur Quantifizierung von gentechnisch veränderter Soja. *Dtsch. Lebensm. Rundschau*, **97**, **4**, 121-123.

Wenk, N., Stebler, D., Bickel, R. (2001). Warenflusstrennung von GVO in Lebensmitteln. Endbericht. Prognos, Europäisches Zentrum für Wirtschaftsforschung und Strategieberatung.

Westermeier, R. (1997). Electrophoresis in practice: a guide to methods and applications of DNA and Protein separations. **2. Ed.** VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim, New York, Basel, Cambridge.

WHO (1994). Environmental Health Criteria 159: Glyphosate, IPCS, Geneva.

Wurz, A., Willmund, R. (1997). Identification of transgenic glyphosate-resistant soybeans, in: Schreiber, G.A., Bögl, K.W., (Hrsg.). *Foods Produced By Means of Genetic Engineering-2nd Status Report*, BgVV-Hefte 01/1997, 115-117, (1997).

Wurz, A., Bluth, A., Zeltz, P., Pfeifer, C., Willmund R. (1999). Quantitative analysis of genetically organisms (GMO) in processed food by PCR-based methods. Food control **10**, 385-389.

Yaklich, R. (2001). <http://bldg6.arsusda.gov/sarl/byaklich/byaklich.html>

Yates, K., ed (1999). Detection Methods for Novel Foods Derived from Genetically Modified Organisms. ILSI Europe.

Zagon, J., Schulze, M., Broll, H., Schauzu, M., (Hrsg.) (1998). Methoden zum Nachweis der gentechnischen Veränderung in glyphosatresistenten Sojabohnen und zur Identifizierung anderer gentechnisch veränderter Pflanzen. BgVV-Hefte 03/1998.

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 1998 bis März 2002 in der Arbeitsgruppe Neuartige Lebensmittel und Gentechnik (FG 213) im jetzigen Bundesinstitut für Risikobewertung BfR (ehemals Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin) in Teilkoooperation mit dem Institut für Lebensmittelchemie der Technischen Universität Berlin angefertigt. Die Arbeit wurde sowohl durch die finanzielle Unterstützung von Werkverträgen und im Rahmen von Sonderforschungsaufgaben durch das BgVV in Zusammenarbeit mit der TU Berlin ermöglicht.

Meinem Doktorvater, Prof. Dr. rer. nat. Hans-Jürgen Stan möchte ich ganz besonders für seine Hilfsbereitschaft bei der Finanzierung und der Erledigung und Organisation sämtlicher Formalitäten danken. Ebenso gilt ihm mein Dank für die Betreuung der Arbeit, seine stets vorhandene Diskussionsbereitschaft und sein ständiges Interesse am Fortschritt der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Reiner Wittkowski danke ich für die Übernahme der Tätigkeit des zweiten Berichters.

Frau Dr. Schauzu, Herrn Dr. Winkler und Frau Grande möchte ich für die angenehme Atmosphäre im FG 213 danken.

Mein Dank gilt Hermann Broll, dessen unermüdliche Diskussionsbereitschaft wesentlich zum Fortgang dieser Arbeit beigetragen hat. Ebenso möchte ich Frau Dr. Jutta Zagon für den Erfahrungsaustausch auf dem Gebiet der Proteinanalytik danken.

Den Kolleginnen Almut Leffke, Ali Spiegelberg, Bettina Linke und Ute Wagner aus dem „FG 213“ möchte ich an dieser Stelle für die freundliche, beratende und konstruktive Arbeitsatmosphäre danken. Bei Andreas Butschke möchte ich mich für die ständige Hilfsbereitschaft bei der Lösung aller kleinen und großen Probleme sowie für seine erstaunliche Geduld bedanken. Nicht unerwähnt bleiben soll seine Fachkompetenz bei der Lösung sämtlicher Computerfragen. Der Gedankenaustausch mit Ines Laube bei allen den „TaqMan“ betreffenden und auch anderen Fragen und die angenehme Atmosphäre in unserem Büro hat im Verlauf dieser Arbeit sehr geholfen.

Frau Zimmermann möchte ich für die Abwicklung der finanziellen Förderung danken, durch die diese Arbeit erst zustande kommen konnte.

Ein besonderes Dankeschön geht an meine Eltern, die mir durch ihre finanzielle Unterstützung das Studium der Lebensmittelchemie erst ermöglicht haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Freund Berthold, der mich während des gesamten Studiums tatkräftig unterstützt hat und mir stets zur Seite gestanden hat.

LEBENS LAUF

Name:	Bärbel Jansen
Anschrift:	Oderberger Str. 42, 10435 Berlin
Geburtsdatum:	10.01.1967
Geburtsort:	Rheydt
Familienstand:	ledig
1973 - 1978	Grundschule in Rheydt
1978 - 1986 Abitur	Hugo-Junkers-Gymnasium in Rheydt, Abschluss
04/1987 – 03/1989	Ausbildung zur med.-tech. Laboratoriumsassistentin (MTA) am St. Elisabeth Krankenhaus Köln-Hohenlind, Abschluß Staatsexamen
04/1989 – 03/1991	Anstellung als MTA im Krankenhaus Zehlendorf, Bereich Heckeshorn, Berlin
04/1991 – 01/1996	Studium der Lebensmittelchemie, Technische Universität Berlin, Teil A der Hauptprüfung für Lebensmittelchemiker
06/1996 – 01/1997	Diplomarbeit „Nachweis potentiell allergener Selleriebestandteile in ausgewählten Lebensmitteln: Arbeiten zur Entwicklung einer immunochemischen Analysenmethode“ am Forschungsinstitut Borstel
07/1997 – 02/1998	Praktikum zur staatlich geprüften Lebensmittelchemikerin im Berliner Betrieb für Zentrale Gesundheitliche Aufgaben, Teil B der Hauptprüfung für Lebensmittelchemiker
06/1998 – 12/1999	Werkverträge am BgVV zu Promotionszwecken
01/2000 – 04/2002	wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Lebensmittelchemie der TU Berlin im Kooperationsprojekt mit dem BgVV „Entwicklung von Nachweisverfahren für die gentechnisch veränderten Roundup Ready [®] Sojabohnen“
seit 05/2002	Anstellung als wissenschaftliche Mitarbeiterin im Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) im Rahmen des Bundesprogrammes Ökologischer Landbau